

**Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek**

**Antonija Šoštarić**

**Učinak cinka na stres uzrokovan kadmijem  
u vodenoj leći (*Lemna minor* L.)**

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2012.**

Ovaj rad, izrađen je u Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Željke Vidaković–Cifrek i doc. dr. sc. Mirte Tkalec, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

*Iskreno se zahvaljujem voditeljicama rada doc. dr. sc. Željki Vidaković–Cifrek i doc. dr. sc. Mirti Tkalec na stručnim savjetima, pomoći i strpljenju tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem svim ostalim članovima Botaničkog zavoda koji su pomogli u izradi.*

*Hvala mojoj obitelji na podršci, potpori i strpljenju koju su mi pružili tijekom cijelog studija.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno–matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

### UČINAK CINKA NA STRES UZROKOVAN KADMIJEM U VODENOJ LEĆI (*Lemna minor* L.)

Antonija Šoštarić  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

Kadmij je široko rasprostranjen, neesencijalan teški metal, koji je toksičan za biljne organizme. Cink je važan esencijalni element, uključen u važne metaboličke procese, primjerice aktivnost i sintezu proteina i nukleinskih kiselina, fotosintezu, a potreban je za normalan rast biljaka. Cilj istraživanja bio je utvrditi utjecaj kadmija (10  $\mu\text{M}$ ) i cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ), te njihove kombinacije, na vodenu leću (*Lemna minor* L.). Kao pokazatelji oksidacijskog stresa praćeni su rast, sadržaj vodikovog peroksida, malondialdehida i karbonila, aktivnost lipoksigenaze te prisutnost proteina toplotnog stresa. Utvrđeno je da kadmij (10  $\mu\text{M}$ ) inhibira rast i uzrokuje oksidacijski stres što je vidljivo po porastu sadržaja vodikovog peroksida, malondialdehida i karbonila, te povećanoj aktivnosti enzima lipoksigenaze. Više koncentracije cinka (100  $\mu\text{M}$ ) uzrokuju umjereni oksidacijski stres, prilikom čega je primijećen smanjen prirast biljaka i povećan sadržaj vodikovog peroksida i karbonila. Cink u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  nije uzrokovao oksidacijski stres. Pri istovremenom tretmanu kadmijem (10  $\mu\text{M}$ ) i višom koncentracijom cinka (100  $\mu\text{M}$ ) uočeno je da je cink ublažio djelovanje kadmija. Prirast biljaka je bio viši, uz istovremeno smanjenje lipidne peroksidacije i aktivnosti lipoksigenaze, a prisutna je bila i dodatna izoforma proteina toplotnog stresa molekularne mase  $\sim 69$  kDa. Istovremeni tretman kadmijem i nižom koncentracijom cinka (50  $\mu\text{M}$ ) nije doveo do smanjenja oksidacijskog stresa.

52 stranice, 9 slika, 5 tablica, 89 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: oksidacijski stres, rast, lipidna peroksidacija, karbonili, lipoksigenaza, vodikov peroksid, proteini toplotnog stresa

Voditelj 1: Dr. sc. Željka Vidaković–Cifrek, doc.

Voditelj 2: Dr. sc. Mirta Tkalec, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Željka Vidaković–Cifrek, doc.

Dr. sc. Ivančica Ternjej, izv. prof.

Dr. sc. Višnja Besendorfer, izv. prof.

Rad prihvaćen: 27. lipnja 2012.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Graduation Thesis

### **EFFECT OF ZINC ON STRESS CAUSED BY CADMIUM IN DUCKWEED (*Lemna minor* L.)**

Antonija Šoštarić  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cadmium is a widespread, non-essential heavy metal, which is toxic to plant organisms. Zinc is an essential element, involved in important metabolic processes, such as activity and synthesis of proteins and nucleic acids, photosynthesis, and is required for normal plant growth. The aim of this study was to determine the effect of cadmium (10  $\mu\text{M}$ ) and zinc (50 and 100  $\mu\text{M}$ ), and their combinations, on duckweed (*Lemna minor* L.). Growth, content of hydrogen peroxide, malondialdehyde, carbonyls, activity of lipooxygenase and presence of heat shock proteins were observed as indicators of oxidative stress. It was found that cadmium (10  $\mu\text{M}$ ) inhibited growth and caused oxidative stress, which was evident by the increased contents of hydrogen peroxide, malondialdehyde and carbonyls, and increased activity of the lipooxygenase. Higher concentration of zinc (100  $\mu\text{M}$ ) caused a moderate oxidative stress, during which the reduced growth and increased content of hydrogen peroxide and carbonyls were present. Zinc at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  didn't cause oxidative stress. In combined action of cadmium (10  $\mu\text{M}$ ) and higher concentration of zinc (100  $\mu\text{M}$ ) it was observed that zinc alleviated effects of cadmium. The growth rate was higher, lipid peroxidation and activity of lipooxygenase were reduced, and an additional isoform of heat shock protein, molecular weight ~69 kDa, was present. In combination of cadmium and zinc, when zinc was present in lower concentration (50  $\mu\text{M}$ ), the results didn't show reduction in oxidative stress.

52 pages, 9 figures, 5 tables, 89 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: oxidative stress, growth, lipid peroxidation, carbonyls, lipooxygenase, hydrogen peroxide, heat shock proteins

Supervisor 1: Dr. Željka Vidaković–Cifrek, Asst. Prof.

Supervisor 2: Dr. Mirta Tkalec, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Željka Vidaković–Cifrek, Asst. Prof.

Dr. Ivančica Ternjej, Assoc. Prof.

Dr. Višnja Besendorfer, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 27. June 2012.

## POPIS KRATICA

<b>ABA</b>	apscizinska kiselina
<b>ACC</b>	1–aminociklopropan–1–karboksilna kiselina
<b>ANOVA</b>	<i>The Analysis Of Variance</i>
<b>APS</b>	amonij peroksidisulfat
<b>APX</b>	askorbat peroksidaza
<b>BCIP/NBT</b>	5–bromo–4 kloro–3–indolilfosfat/nitrotetrazolium modriilo
<b>CAT</b>	katalaza
<b>DNMRT</b>	<i>Duncun New Multiple Range Test</i>
<b>DNPH</b>	2,4–dinitrofenilhidrazin
<b>EDTA</b>	etilendiamintetraoctena kiselina
<b>GPX</b>	glutation peroksidaza
<b>GR</b>	glutation reduktaza
<b>GST</b>	glutation S–transferaza
<b>HSP</b>	proteini toplotnog stresa
<b>LOX</b>	lipoksigenaza
<b>MDA</b>	malondialdehid
<b>NADPH</b>	nikotinamid–adenin–dinukleotid–fosfat
<b>PBS</b>	fosfatni pufer
<b>PUFA</b>	polinezasićena masna kiselina
<b>PVP</b>	polivinilpirolidon
<b>ROS</b>	reaktivni oblici kisika
<b>SDS</b>	natrijev dodecil sulfat
<b>SDS–PAGE</b>	natrijev dodecil sulfat–poliakrilamid gel elektroforeza
<b>SOD</b>	superoksid dismutaza
<b>TBA</b>	tiobarbituratna kiselina
<b>TBARS</b>	reaktivni spojevi tiobarbituratne kiseline
<b>TCA</b>	trikloroctena kiselina
<b>TEMED</b>	tetrametiletildiamid
<b>TPBS</b>	fosfatni pufer uz dodatak 1% Tween 20
<b>Tris</b>	tris[hidroksimetil]aminometan

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OKSIDACIJSKI STRES .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Vodikov peroksid.....	3
1.1.2. Lipidna peroksidacija .....	4
1.1.3. Lipoksigenaze .....	5
1.1.4. Oksidacija proteina .....	6
1.1.5. Proteini toplotnog stresa .....	7
<b>1.2. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. TEŠKI METALI .....</b>	<b>9</b>
1.3.1. Kadmij.....	10
1.3.2. Cink.....	13
<b>1.4. VODENA LEĆA.....</b>	<b>14</b>
 <b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	 <b>17</b>
 <b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	 <b>18</b>
<b>3.1. UZGOJ VODENE LEĆE .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2. ODREĐIVANJE PRIRASTA BROJA BILJAKA.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3. ODREĐIVANJE POKAZATELJA OKSIDACIJSKOG STRESA .....</b>	<b>20</b>
3.3.1. Priprema uzoraka.....	20
3.3.2. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida .....	20
3.3.3. Određivanje sadržaja malondialdehida .....	21
3.3.4. Određivanje aktivnosti lipoksigenaze .....	22
3.3.5. Određivanje sadržaja karbonila.....	23
3.3.6. Elektroforeza ukupnih topivih proteina u denaturirajućim uvjetima .....	24
3.3.6.1. Bojanje gela srebrom .....	25
3.3.6.2. Prijenos proteina na membranu i imunodetekcija.....	26
<b>3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....</b>	<b>27</b>

<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>28</b>
4.1. PRIRAST BROJA BILJAKA .....	28
4.2. SADRŽAJ VODIKOVOG PEROKSIDA.....	30
4.3. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA.....	31
4.4. AKTIVNOST LIPOKSIKGENAZE .....	32
4.5. SADRŽAJ KARBONILA .....	33
4.6. PROTEINI TOPLOTNOG STRESA.....	34
 5. RASPRAVA.....	 36
 6. ZAKLJUČAK .....	 45
 7. LITERATURA .....	 46



## 1. UVOD

Biljke su na svojim prirodnim staništima izložene djelovanju različitih okolišnih čimbenika, koji mogu imati nepovoljan utjecaj i uzrokovati stres. Stres je bilo koji čimbenik koji smanjuje rast i razmnožavanje biljaka ispod potencijala genotipa (Osmond i sur. 1987), a nastupa kada je vrijednost stresnog čimbenika izvan granica mogućnosti adaptacije. Stres djeluje na rast, razvoj i reprodukciju biljaka. Ekološki čimbenici koji najčešće uzrokuju stres su biotički, poput napada patogena, te abiotički, poput promjena temperature, nedostataka ili suvišaka vode, povećanog saliniteta, nedostatka kisika u tlu, poremećaja pH vrijednosti tla i prisutnosti teških metala. Adaptacija podrazumijeva genetski uvjetovanu otpornost, a rezultat je selekcije tijekom mnogo generacija (Pevalek–Kozlina 2003). U stresnim uvjetima biljke pokazuju dva tipa adaptacije: toleranciju ili izbjegavanje. Mehanizmi tolerancije, u uvjetima umjerenog stresa, omogućavaju biljkama održavanje visoke metaboličke aktivnosti, a ukoliko se utjecaj stresa dodatno poveća metabolička aktivnost se smanjuje. Mehanizmi izbjegavanja omogućavaju smanjenje metaboličke aktivnosti i potiču stanje mirovanja u uvjetima ekstremnog stresa (Osmond i sur. 1987). Veliki broj biljnih vrsta izbjegava nepovoljan zimski period tako da završe životni ciklus u toplijem dijelu godine.

Kao što je ranije spomenuto, biljke često pokazuju određenu otpornost na stres. Prethodnim izlaganjem blagim stresnim uvjetima može se povećati otpornost na stres, odnosno dolazi do aklimatizacije biljke na nepovoljne uvjete. Odgovori na različite tipove stresa često se preklapaju, zbog čega izlaganje jednom tipu stresa može inducirati određeni stupanj tolerancije i drugih tipova stresa (Pevalek–Kozlina 2003).

### 1.1. OKSIDACIJSKI STRES

Evolucija aerobnih metaboličkih procesa, kao što su disanje i fotosinteza, neizbježno je dovela do stvaranja reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) u mitohondrijima, kloroplastima i peroksisomima (Apel i Hirt 2004).

ROS su djelomično reducirani oblici molekularnog kisika ( $O_2$ ). Ostali izvori ROS su glioksisomi, citosol, plazmatska membrana, stanična stijenka i endoplazmatski retikulum (Greene 2002).

Singletni kisik ( $^1O_2$ ) nastaje u procesu fotosinteze prijenosom ekscitacijske energije s tripletnog klorofila na molekulu kisika, prilikom čega dolazi do promjene spina elektrona. Također singletni kisik može nastati kao nusprodukt aktivnosti lipoksigenaze.  $^1O_2$  lako difundira i reagira s organskim molekulama te oštećuje tilakoidne membrane (Arora i sur. 2002). Drugi aktivirani oblici kisika nastaju prijenosom elektrona na kisik, prilikom čega nastaju superoksidni radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) ili hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ) (Mittler 2002).

ROS se razlikuju po kemijskim i fizikalnim svojstvima kao što su topivost, mogućnost difuzije i reakcije s različitim biološkim molekulama (Tablica 1.).

**Tablica 1.** Reaktivni oblici kisika (ROS) (preuzeto Štefan i sur. 2007)

Slobodni radikali	Tvari koje nisu slobodni radikali
superoksidni $O_2^{\cdot-}$	vodikov peroksid $H_2O_2$
hidroksilni $OH^{\cdot}$	ozon $O_3$
peroksilni $ROO^{\cdot}$	singletni kisik $^1O_2$
alkoksilni $RO^{\cdot}$	
hidroperoksilni $HO_2^{\cdot}$	

ROS se u određenoj količini stvaraju u biljkama i tijekom metabolizma u optimalnim uvjetima (Arora i sur. 2002). ROS u biljaka, posebno superoksidni radikal i vodikov peroksid, služe kao signalne molekule u kontroli programirane stanične smrti, odgovorima na abiotički stres, napad patogena, te u sistemskom odgovoru na patogene. Jedan od prvih signala o promjenama u okolišu je proizvodnja superoksidnog radikala u plazmatskoj membrani (Foyer i Noctor 2005). Inducirana stanična smrt, signalizirana od strane ROS, može biti rezultat oksidativnih procesa kao što je lipidna peroksidacija membrana, oksidacija proteina, inhibicija enzima i oštećenje molekula DNA i RNA (Mittler 2002). U mnogim slučajevima stvaranje ROS je genetski programirano, inducirano tijekom normalnog razvoja, kao što je

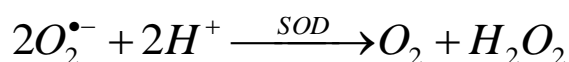
sazrijevanje sjemenki (Greene 2002), ili promjenama u okolišu, pa zato ima kompleksne učinke na primarni i sekundarni metabolizam (Foyer i Noctor 2005).

Zajednička značajka različitih stresnih čimbenika je njihov potencijal povećavanja proizvodnje ROS u biljnom tkivu. Takvi stresni čimbenici mogu biti suša, solni stres, ekstremne temperature, teški metali, UV zračenje, manjak hranjivih tvari, napad patogena, visok intenzitet svjetlosti, herbicidi i atmosferski onečišćivači (SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>) (Arora i sur. 2002, Mittler 2002).

ROS inaktiviraju enzime i oštećuju važne stanične komponente poput molekule DNA i proteina (Apel i Hirt 2004, Schützendübel i Polle 2002). Učinak djelovanja na membrane uključuje indukciju lipidne peroksidacije i deesterifikaciju masnih kiselina, što dovodi do gubitka membranskog integriteta i promjena u membranskoj propusnosti (Arora i sur. 2002, Aravind i Prasad 2003).

### 1.1.1. VODIKOV PEROKSID

Vodikov peroksid nastaje dismutacijom superoksidnog radikala (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), što može biti spontani proces ili rezultat djelovanja enzima superoksid dismutaze (SOD) (Veal i sur. 2007):

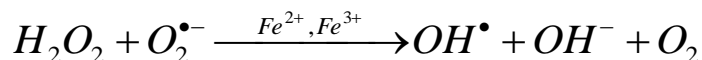


Drugi izvor vodikovog peroksida je djelovanje glikolat oksidaze u peroksisomima tijekom fotorespiracije (Mittler 2002) i β-oksidacija masnih kiselina (Greene 2002).

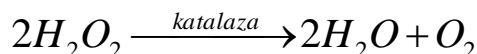
Kod eukariota vodikov peroksid ima važnu ulogu kao signalna molekula u regulaciji mnogih bioloških procesa, potiče sekundarni stanični metabolizam, zatvaranje puči, strukturne promjene, poput lignifikacije, te programiranu staničnu smrt (Schützendübel i sur. 2001, Neill i sur. 2002). Djelujući na transkripcijske faktore H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utječe na ekspresiju različitih gena, uključujući i gene koji kodiraju antioksidacijske enzime (Neill i sur. 2002).

Vodikov peroksid je stabilnija i manje reaktivna molekula od ostalih vrsta ROS, ali veoma toksična za stanice te lako difundira preko membrana. U Haber–Weissovoj reakciji sa superoksidnim radikalom (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) i željeznim (II) ionom (Fe<sup>2+</sup>) stvara veoma reaktivni hidroksilni radikal (OH<sup>•</sup>), koji oštećuje sve vrste biološki važnih

makromolekula, posebno nukleinske kiseline i proteine, te potiče lipidnu peroksidaciju (Greene 2002):



Vodikov peroksid se razgrađuje djelovanjem enzima katalaze (CAT) u peroksisomima (Pevalek–Kozlina 2003):



Kako je katalaza ograničena prvenstveno na peroksisome, u kloroplastima djeluje askorbat–glutationski ciklus, u kojem se  $H_2O_2$  reducira do vode uz pomoć NADPH (Pevalek–Kozlina 2003).

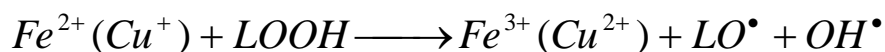
### 1.1.2. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Promjene fizičkih svojstava stanične membrane i njezinih funkcija ubrajaju se u nespecifične reakcije na stres. Glavni sastojci membranskih lipida su polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) koje su posebno osjetljive na lipidnu peroksidaciju.

Lipidna peroksidacija je oksidacija nezasićenih masnih kiselina u prisutnosti slobodnih radikala (Gutteridge 1995). Najčešće ju uzrokuje hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ ), međutim i drugi radikali mogu pokrenuti proces peroksidacije: alkoksilni radikal ( $RO^{\bullet}$ ), peroksilni radikal ( $ROO^{\bullet}$ ), ali ne i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Gutteridge 1995).

Proces lipidne peroksidacije obilježavaju tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijalna reakcija između nezasićenih masnih kiselina i hidroksilnog radikala uključuje uklanjanje atoma vodika iz metilenske skupine ( $-CH_2-$ ) masnih kiselina. Nastali ugljikovi radikali nastoje se stabilizirati reorganizacijom molekula, oblikujući konjugirane diene. U aerobnim uvjetima konjugirani dieni se mogu spajati s molekularnim kisikom ( $O_2$ ), te stvarati peroksilne radikale  $LOO^{\bullet}$  koji dalje uklanjaju vodik iz drugih organskih molekula, uključujući polinezasićene masne kiseline, čime započinju lančanu reakciju (Gutteridge 1995). Dolazi do stvaranja lipidnih hidroperoksida (uključujući cikličke peroksidge), te reaktivnih ugljikovih radikala koji

nastavljaju reakciju peroksidacije (faza propagacije). Željezo može, putem Fentonove reakcije, reagirati s lipidnim hidroperoksidima (LOOH) (Mittler 2002) dajući lipidne alkoksilne radikale ( $LO^\bullet$ ) koji mogu dalje pokrenuti kaskadu oksidacijskih reakcija (Gutteridge 1995):



Intenzivna lipidna peroksidacija u biološkim membranama dovodi do smanjenja fluidnosti membrana, promjene membranskog potencijala i povećanja permeabilnosti za vodikove i druge ione (Gutteridge 1995).

Lanac reakcija radikala lipidne peroksidacije prekida se neenzimskim i enzimskim načinom. Važan antioksidans je  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), koji je sastavni dio membrana (Gutteridge 1995).

Stupanj oštećenja lipida može se odrediti mjerenjem količine malondialdehida (MDA) i drugih produkata lipidne peroksidacije (Balen i sur. 2011).

### 1.1.3. LIPOKSI GENAZE

Lipoksigenaze (LOX) su skupina enzima koji sadrže nehemski vezano željezo, a široko su rasprostranjeni u biljaka i životinja. U biljkama su prisutne u više izoformi (Skórzyńska–Polit i Krupa 2003), a mogu se razlikovati po svojim svojstvima, kinetičkim parametrima ili specifičnošću za supstrat (Skórzyńska–Polit i sur. 2005). Lipoksigenaze su povezane s nekim procesima u normalnim razvojnim fazama, kao što je mobilizacija lipida tijekom klijanja, degradacija membrana tijekom starenja, a također se koriste i kao spremišni proteini tijekom vegetativnog rasta (Porta i Rocha–Sosa 2002).

LOX kataliziraju dodavanje molekularnog kisika (dioksigenazna reakcija) na polinezasićene masne kiseline koje sadrže cis, cis–1,4–pentadienski sustav, prilikom čega nastaje hidroperoksid nezasićenih masnih kiselina. Kisik može biti dodavan na oba kraja pentadienskog sustava. LOX potiču sintezu grupe cikličkih i necikličkih spojeva, zajedničkog imena oksilipini. Oksilipini su produkti oksidacije masnih kiselina, a imaju različite funkcije u stanicama, kao što je signalna tijekom

diferencijacije, ranjavanja te napada patogena i insekata (Porta i Rocha–Sosa 2002, Andersson i sur. 2006).

LOX u biljkama najčešće djeluje na linolnu i linolensku kiselinu, prilikom čega se stvaraju dva moguća produkta, 9– i 13–hidroperoksi masna kiselina (Porta i Rocha–Sosa 2002). Hidroperoksidi masnih kiselina se dalje mogu djelovanjem enzima pretvoriti u različite spojeve (Porta i Rocha–Sosa 2002). Ovi enzimi mogu biti: hidroperoksid dehidraza (HPDS), hidroperoksid lijaza (HPLS), hidroperoksid izomeraza (HPIS), hidroperoksid–ovisna peroksigenaza (HPPR) i hidroperoksid–ovisna epoksigenaza (HPEP) (Gardner 1991).

Produkti hidroperoksidacije polinezasićenih masnih kiselina mogu proći autokatalitičku degradaciju, stvarajući radikale koji dalje mogu pokrenuti lančanu reakciju lipidne peroksidacije (Blokina i sur. 2003).

Ekspresija gena koji kodiraju LOX regulirana je različitim efektorima, kao što su jasmonska kiselina (JA) i apscizinska kiselina (ABA), ali također i različitim stresnim čimbenicima (Porta i Rocha–Sosa 2002).

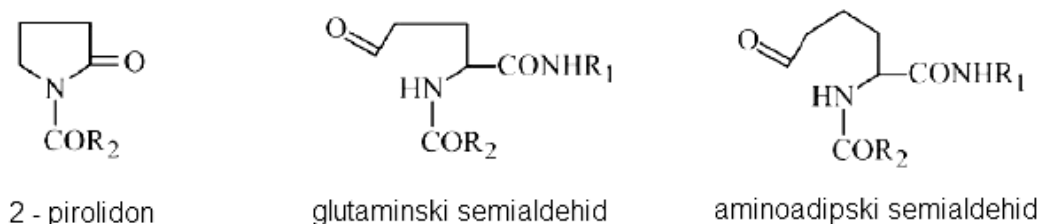
Različiti organi i tkiva pokazuju različitu lipoksigenaznu aktivnost, koja se mijenja kao odgovor na biotički i abiotički stres, poput manjka vode, ranjavanja i napada patogena (Porta i Rocha–Sosa 2002). Povećana aktivnost također je uočena i kod stresa uzrokovanog teškim metalima (Skórzyńska–Polit i Krupa 2003).

#### 1.1.4. OKSIDACIJA PROTEINA

ROS su uključeni u mnoge reakcije modifikacija proteina. Među tim reakcijama karbonilacija je privukla veliku pozornost zbog svoje ireverzibilne prirode (Nyström 2005), te se stoga koristi kao pokazatelj oksidacijskog stresa (Job i sur. 2005). Kako bi se ireverzibilno promijenjeni karbonilni proteini uklonili stanica ih mora razgraditi (Nyström 2005).

Karbonilne (CO) grupe (aldehidne i ketonske) nastaju oksidacijom proteinskih bočnih lanaca, najčešće prolina, arginina, lizina i treonina. Reakcija je katalizirana metalima (eng. *metal-catalyzed oxidation*, MCO) (Dalle–Donne i sur. 2003). Nastankom karbonilnih grupa mijenja se ili inhibira aktivnost proteina, dok se istovremeno povećava osjetljivost na proteolitičku razgradnju (Job i sur. 2005).

Karbonilni derivati lizina, cisteina i histidina mogu nastati i u sekundarnim reakcijama s reaktivnim karbonilnim komponentama na ugljikohidratima (produkti glikooksidacije), lipidima i krajnjim produktima lipidne peroksidacije (malondialdehid). Kvantitativno najvažniji produkti reakcije karbonilacije su glutaminski semialdehid arginina i prolina (*Slika 1.*) te aminoadipski semialdehid lizina (Nyström 2005, Dalle–Donne i sur. 2003).



**Slika 1.** Struktura karbonilnih derivata nastalih direktnom oksidacijom aminokiselinskih bočnih lanaca (preuzeto Dalle–Donne i sur. 2003)

Istraživanja pokazuju da se karbonilacija proteina povećava sa starošću stanica i tkiva (Nyström 2005).

Karbonilacija proteina u ljudi je povezana s mnogim bolestima kao što su Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest, reumatoidni artritis, kronično zatajenje bubrega, dijabetes i sepsa (Nyström 2005, Dalle–Donne i sur. 2003).

### 1.1.5. PROTEINI TOPLOTNOG STRESA

Proteini toplotnog stresa (eng. *heat shock proteins*, HSP) pojavljuju se u povećanoj količini kao odgovor na povišenje temperature, ali poznato je da do njihove ekspresije dolazi u različitim okolišnim uvjetima, uključujući stres uzrokovan teškim metalima (Hall 2002). Nađeni su u svim grupama živih organizama, od arheobakterija do životinja (Lindquist i Craig 1988). HSP djeluju kao molekularni šaperoni u sastavljanju i rastavljanju proteinskih podjedinica, a također sudjeluju u obrani i popravku proteina u stresnim uvjetima (Hall 2002).

Na temelju molekularnih masa grupirani su u pet razreda: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 i HSP niske molekularne mase (smHSP) (Wang i sur. 2004).

Osnovna funkcija HSP70 je sprečavanje agregacije i održavanje konformacije proteina u normalnim i stresnim uvjetima. Uključeni su i u prijenos te olakšavanje proteolitičke razgradnje nestabilnih proteina koje usmjeravaju na lizosome ili proteosome (Wang i sur. 2004). Neki HSP70 su uključeni u sastavljanje polipeptida sintetiziranih *de novo*, prijenos prekursorskih molekula i biološku kontrolu regulatornih proteina. Obilježje nekih članova ovog razreda je konstitutivna ekspresija, dok se ostali induciraju u stresnim uvjetima (Wang i sur. 2004).

Strukturno se HSP70 sastoji od visoko konzervirane N-terminalne ATP-vezujuće domene molekularne težine 44 kDa, i C-terminalne peptid-vezujuće domene, koja je varijabilna i određuje supstratnu specifičnost (Wang i sur. 2004).

U istraživanju na vrsti *Lycopersicon peruvianum* uočena je povezanost između aktivnosti HSP70 i stresa uzrokovanog kadmijem. HSP70 je imunocitokemijskim tehnikama lokaliziran u jezgri i citoplazmi, ali također i u staničnoj membrani, što sugerira na moguću ulogu HSP70 u zaštiti membrane od oštećenja (Hall 2002).

Pojačana ekspresija HSP70 uočena je u algi *Enteromorpha intestinalis* nakon izloženosti različitim stresnim čimbenicima. Također je uočeno da prethodno izlaganje kratkotrajnom toplotnom stresu povećava otpornost na stres uzrokovan teškim metalima (Hall 2002).

## 1.2. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV

Biljne stanice su razvile zaštitne mehanizme koji im omogućuju smanjivanje proizvodnje ROS ili njihovo brzo uništavanje (Greene 2002). Antioksidans je svaka molekula koja inaktivira ROS, a sama se pritom ne pretvara u destruktivni oblik.

Kapacitet i aktivnost antioksidacijskog obrambenog sustava važni su u ograničavanju oksidacijskog oštećenja i uništavanju ROS. Kao odgovor na stresne uvjete povećava se aktivnost antioksidacijskih obrambenih sustava. Do oksidacijskog stresa dolazi kada je produkcija ROS veća od kapaciteta antioksidacijskog sustava (Arora i sur. 2002).

Antioksidacijski sustav može štititi stanicu na nekoliko načina: sprečavanjem nastanka slobodnih radikala, neutralizacijom nastalih radikala, popravkom oštećenja



nastalih djelovanjem radikala i povećanim uklanjanjem oštećenih molekula (Štefan i sur. 2007).

Antioksidacijski mehanizmi mogu biti enzimski i neenzimski. Enzimski mehanizmi uključuju superoksid dismutazu (SOD) koja uklanja superoksidni radikal uz nastajanje molekularnog kisika i vodikovog peroksida, askorbat peroksidazu (APX), katalazu (CAT) i glutation peroksidazu (GPX) za uklanjanje vodikovog peroksida i organskih peroksida, te glutation reduktazu (GR) (Štefan i sur. 2007).

Neenzimski mehanizmi uklanjanja ROS uključuju antioksidanse male molekularne mase kao što su askorbat (vitamin C), glutation,  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), fenolni spojevi i karotenoidi (Blokhina i sur. 2003).

### 1.3. TEŠKI METALI

Teški metali su elementi koji imaju gustoću veću od  $5 \text{ g cm}^{-3}$ . Od 90 elemenata prisutnih u prirodi 53 su teški metali. Na temelju topivosti u fiziološkim uvjetima, 17 elemenata je dostupno živim organizmima i značajni su za biljne i životinjske zajednice u različitim ekosustavima. Među njima su željezo (Fe), molibden (Mo) i mangan (Mn), cink (Zn), nikal (Ni), bakar (Cu) važni kao esencijalni mikroelementi (Pevalek–Kozlina 2003). Srebro (Ag), arsen (As), živa (Hg), kadmij (Cd), olovo (Pb) i antimon (Sb) nemaju poznate uloge u biljnim stanicama, te su u većoj ili manjoj mjeri toksični za biljke i mikroorganizme (Benavides i sur. 2005, Schützendübel i Polle 2002).

Oblik teškog metala u vodenoj otopini tla ovisi o samom metalu, pH vrijednosti tla i prisutnosti drugih iona (Das i sur. 1997). Njihova dostupnost u tlu ovisi o prirodnim procesima; posebno litogenim i pedogenim, ali i o djelovanju čovjeka, npr. rudarstvu, izgaranju fosilnih goriva, urbanom otpadu, metalnoj industriji, upotrebi gnojiva, te postrojenja za preradu otpadnih voda (Hasan i sur. 2009). Porast industrijske i rudarske aktivnosti krajem 19. i početkom 20. stoljeća dovodi do povećanja zagađenja teškim metalima (Benavides i sur. 2005).

Prisutnost esencijalnih i neesencijalnih teških metala u atmosferi, tlu i vodi u prekomjernim količinama može imati nepovoljne učinke na sve organizme. Poznavanje interakcija metala i biljaka važna je za zaštitu biljaka u okolišu, ali i za

smanjenje rizika povezanog s uvođenjem tih metala u hranidbeni lanac (Benavides i sur. 2005).

Visoke koncentracije teških metala u tlu toksične su za većinu biljaka (Hasan i sur. 2009), a simptomi oštećenja mogu biti posljedica niza međudjelovanja na staničnoj razini (Benavides i sur. 2005). Izuzetak su biljke hiperakumulatori koje mogu primiti veću količinu teških metala bez značajnih posljedica za metabolizam. Hiperakumulacija metala prisutna je u više od 500 biljnih vrsta koje pripadaju 101 porodici. Među njima su i biljke iz porodica *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cyperaceae*, *Cunouniaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Violaceae* i *Euphobiaceae*. Hiperakumulacija ovisi o biljnoj vrsti, svojstvima tla (pH vrijednosti, organskim humusnim tvarima, kapacitetu izmjene kationa) i vrsti teškog metala (Sarma 2011).

Teški metali utječu na primanje esencijalnih mineralnih tvari, funkciju membrana, vodnu ravnotežu i klijanje sjemenki (Hasan i sur. 2009). Mogu se vezati na sulfhidrilne grupe u proteinima, što dovodi do narušavanja njihove strukture, a time i inhibicije njihove aktivnosti (Das i sur. 1997). Višak teških metala potiče stvaranje slobodnih radikala i reaktivnih oblika kisika (Benavides i sur. 2005), što je vidljivo po lipidnoj peroksidaciji i akumulaciji vodikovog peroksida (Schützendübel i Polle 2002).

### 1.3.1. KADMIJ

Kadmij (gustoća  $8,6 \text{ g cm}^{-3}$ ) je široko rasprostranjeni teški metal. Kao element otkriven je 1817. godine (Shanker 2008). Izvor kadmija u okolišu su elektrane, toplane, metalna industrija, spalionice otpada, tvornice cementa, promet, te je također nusprodukt proizvodnje fosfatnih gnojiva (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999). Sastavni je dio pigmenata, stabilizatora plastike i elektrokemijskih izvora električne energije (Prasad i sur. 2001). U područjima s malim antropogenim utjecajem oslobađa se mineraliziranjem stijena (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999) i vulkanskom aktivnošću (Schützendübel i Polle 2002). Godišnje se proizvede preko 22000 tona kadmija (Sarma 2011). Prepoznat je kao izuzetno značajan zagađivač zbog visoke toksičnosti i velike topljivosti u vodi (Benavides i sur. 2005).

Kadmij je toksičan za ljude, životinje i biljke (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999, Shanker 2008). Kod ljudi može uzrokovati osteoporozu, anemiju, oštećenje bubrega i jetre. Potencijalni je karcinogen, povezan s nastankom karcinoma pluća, gušterače i bubrega (Valko i sur. 2005). Duhan sadrži znatne količine kadmija, tako da je pušenje jedan od glavnih načina unosa u ljudski organizam (Shanker 2008). Kao neesencijalan element kadmij negativno utječe na rast i razvoj biljaka, stimulira sekundarni metabolizam i lignifikaciju (Schützendübel i Polle 2002). Kloroza, uvrnutost lišća i smanjeni rast glavni su i lako vidljivi simptomi toksičnosti kadmija u biljkama (Das i sur. 1997).

Biljke kadmij primaju korijenom, te su na njemu vidljiva prva oštećenja (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999). Na razini unosa u stanicu, ion kadmija je u kompeticiji za iste membranske prijenosnike koji služe za unos esencijalnih elemenata kao što su kalij (K), kalcij (Ca), magnezij (Mg), željezo (Fe), bakar (Cu), cink (Zn) i nikal (Ni) (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999). Kloroza se može pojaviti kao posljedica nedostatka željeza, fosfora ili mangana uzrokovanog kadmijem. Inhibicija Fe (III) reduktaze u korijenu djelovanjem kadmija, dovodi do manjka željeza i značajno utječe na fotosintezu (Benavides i sur. 2005).

Kadmij lako prolazi kroz tkivo korijena i prenosi se u nadzemna tkiva. Kad uđe u korijen, do ksilema se prijenosi simplastno i/ili apoplastno, u kompleksu s nekoliko liganada, kao što su organske kiseline i/ili fitohelatini (Benavides i sur. 2005).

Kadmij također smanjuje apsorpciju nitrata i njihov prijenos od korijena do izdanka te inhibira aktivnost nitrat reduktaze u izdancima (Hernández i Cooke 1997). Također djeluje na vodnu ravnotežu, oštećuje fotosintetski aparat djelujući na fotosisteme I i II. Kod uljane repice (*Brassica napus*) je primijećeno da kadmij smanjuje ukupni sadržaj klorofila i karotenoida (Barylá i sur. 2001). Djeluje i na otvorenost puči, ali sam mehanizam djelovanja nije poznat. Pretpostavlja se da djeluje na kretanje iona kalija ( $K^+$ ), kalcija ( $Ca^{2+}$ ) i apscizinsku kiselinu (ABA) u stanicama zapornicama (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999). Kadmij mijenja funkcionalnost membrana uzrokujući lipidnu peroksidaciju, a potiče i promjene metaboličkih reakcija kloroplasta inhibicijom biosinteze klorofila i smanjenjem aktivnosti enzima Calvinova ciklusa (Benavides i sur. 2005).

Kadmij uzrokuje oksidacijski stres, ali za razliku od drugih teških metala, kao što je bakar, ne sudjeluje direktno u stvaranju ROS putem Fentonove i/ili Haber–

Weissove reakcije. Smatra se da su simptomi oksidacijskog stresa, kao što je lipidna peroksidacija, posljedica smanjenja antioksidacijske aktivnosti, što može biti posljedica vezanja iona kadmija i glutaciona (Shanker 2008). Isto tako kadmij inhibira aktivnost nekoliko antioksidacijskih enzima vezanjem na njihove sulfhidrilne grupe (Arora i sur. 2002). U lišću suncokreta *Helianthus annuus* potiče lipidnu peroksidaciju, povećanu aktivnost lipoksigenaze i smanjenje količine antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APOX), glutation reduktaze (GR) i dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) (Gallego i sur. 2005). U vrste *Phaseolus aureus* ioni kadmija potiču lipidnu peroksidaciju, smanjuju aktivnost katalaze, uz istovremeno povećanje aktivnosti gvajakol peroksidaze i askorbat peroksidaze (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999).

Prva linija obrane biljaka je imobilizacija kadmija, a događa se većinom na razini korijena. Uključuje imobilizaciju putem stanične stijenke i izvanstaničnih ugljikohidrata (mukoza, kaloza) (Benavides i sur. 2005). U korijenu i lišću graha ioni kadmija su većinom vezani za pektine i hidroksilne skupine stanične stijenke (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999, Benavides i sur. 2005).

Biljne stanice aktiviraju različite mehanizme obrane kao odgovor na stres uzrokovan kadmijem: sintezu fitohelatina, kompartmentaciju, sintezu metalotioneina, stvaranje etilena, antioksidacijski sustav i sintezu stresnih proteina (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999).

Fitohelatini su stresni polipeptidi opće strukture  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ , sintetizirani iz glutaciona, čija je uloga vezanje (heliranje) kadmija i drugih teških metala i reduciranje njegove toksičnosti (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999).

Kompartimentacijom se onemogućava slobodno kruženje iona kadmija u citosolu. Kompleks fitohelatin–kadmij prenosi se u vaukolu putem specifičnih ABC prenositelja. U vakuoli, zbog niže pH vrijednosti staničnog soka, kompleks disocira, nakon čega se kadmij može vezati s organskim kiselinama prisutnim u staničnom soku (limunska, oksalna ili jabučna kiselina), te vjerojatno s aminokiselinama. Fitohelatine, koji preostaju nakon disocijacije, mogu razgrađivati vakuolarne hidrolaze ili se mogu vratiti u citosol, gdje ponovno mogu vezati ione kadmija. Osim u kompleksu s fitohelatinima, ioni kadmija mogu u vakuolu ući i putem  $\text{Cd}^{2+}/2\text{H}^{+}$  antiportera (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999, Benavides i sur. 2005).

Mehanizam kojim kadmij potiče sintezu etilena još uvijek nije potpuno poznat. Poznato je da u grahu *Phaseolus vulgaris* potiče aktivnost ACC–sintetaze, enzima koji pretvara S–adenozil–metionin u 1–aminociklopropan–1–karboksilnu kiselinu (ACC), koji je neposredni prekursor etilena. Etilen potiče proces lignifikacije, aktivnost askorbat peroksidaze, te regulira ekspresiju gena koji kodiraju metalotionine i proteine toplotnog stresa (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999, Rodríguez-Serrano i sur. 2009).

Metalotionini su polipeptidi male molekularne mase (5–20 kDa), bogati cisteinom, a mogu vezati ione kadmija. Tipični su proteini kralješnjaka, no geni koji ih kodiraju nađeni su i kod biljaka. Njihova uloga u obrani od teških metala još nije u potpunosti otkrivena, no smatra se da, osim što vežu teške metale, imaju i antioksidacijsku ulogu (Benavides i sur. 2005, Mishra i Dubey 2006, Hall 2002).

Kao što je već ranije spomenuto kadmij uzrokuje oksidacijski stres prilikom čega dolazi do povećanja sadržaja ROS. Kako bi smanjile oksidacijsko oštećenje biljke posjeduju enzimski i neneenzimski antioksidacijski sustav čija je uloga opširnije objašnjena u poglavlju 1.2. Kadmij također potiče sintezu HSP, proteina koji sudjeluju u obrani i popravku proteinskih oštećenja nastalih djelovanjem ROS (Hall 2002, Sanità di Toppi i Gabbrielli).

### 1.3.2. CINK

Cink (Zn) je bitna komponenta mnogobrojnih biljnih proteina, ali u suvišku je toksičan. Prijelazni je element atomskog broja 30. Oksidacijski broj mu je +2, a u fiziološkim uvjetima je stabilan, što je rezultat popunjenosti d–orbitale elektronima. Tvori brojne topive soli, uključujući halogenide, sulfate, nitrate, acetate, tiocijanate, perklorate i cijanide, ali tvori i teško topive soli, kao što su cinkov hidroksid i cinkov karbonat (Broadley i sur. 2007).

U stanici je cink sastavni dio metaloenzima, membranskih proteina i DNA–vezujućih proteina (cinkovi prsti) (Aravind i Prasad 2003), kofaktor je enzima kao što su anhidraze, dehidrogenaze, oksidaze i peroksidaze (Rout i Das 2003). Cink ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma dušika, proliferaciji stanica, fotosintezi, disanju, mitozu, sintezi proteina, auksina i nukleinskih kiselina. Esencijalan je element u rastu

biljaka (Rout i Das 2003). Kao sastavni dio Cu/Zn superoksid dismutaze (Cu/Zn SOD) cink ima važnu ulogu u detoksikaciji superoksidnog radikala (Ozdener i Aydin 2010).

Mnoga istraživanja su pokazala da cink u suvišku djeluje toksično na biljke (Rout i Das 2003, Cuypers i sur. 2001), a toksičnost ovisi o koncentraciji u otopini. Opći simptomi toksičnosti su zaostajanje u rastu, uvijanje mladih listova, uginuće listova i kloroza (Rout i Das 2003). Cink, kao i kadmij, uzrokuje oksidacijski stres, iako nije redoks aktivni element i ne sudjeluje u Fentonovoj i/ili Haber–Weissovoj reakciji (Rout i Das 2003). Fitotoksične koncentracije cinka stimuliraju lipoksigenaznu aktivnost (LOX) i povećavaju koncentraciju produkata lipidne peroksidacije (malondialdehida) u primarnim listovima mladica graha *Phaseolus vulgaris* starih 15 dana (Weckx i Clijsters 1997).

Cink i kadmij pripadaju 12. grupi periodnog sustava elemenata. Zbog slične elektronske konfiguracije i valencije imaju slična kemijska svojstva (Aravind i Prasad 2004). Često se zajedno nalaze u rudama, istovremeno konkurirajući za iste ligande. Cinkova rudača sadrži 0,1–5% kadmija (Aravind i Prasad 2004). Poznato je da cink stabilizira i zaštićuje biomembrane od oksidacijskog oštećenja (Aravind i Prasad 2003). U istraživanju na vrsti *Ceratophyllum demersum* kod tretmana sa cinkom i kadmijem uočen je porast sadržaja klorofila u odnosu na tretmane samo s kadmijem. Cink vjerojatno održava sintezu klorofila vezanjem na sulfhidrilne grupe enzima čime ih štiti od oksidacije i stvaranja disulfida (Aravind i Prasad 2004).

## 1.4. VODENA LEĆA

Mala vodena leća (*Lemna minor* L.) je široko rasprostranjena, slobodno plutajuća jednosupnica, prisutna u mnogim vrstama slatkovodnih ekosistema, kao što su jezera, bare, močvare i rukavci vodotokova s niskom brzinom strujanja vode (Vidaković–Cifrek 2007, Paczkowska i sur. 2007). Raste u vodi s visokom razinom hranjivih tvari, pH vrijednosti između 5 i 9 (optimalno 6,5–7,5) i temperaturi između 6 i 33 °C (Leng 1999). U prirodi je važna kao izvor hrane za mnoge močvarne ptice (posebno patke) i ribe (Wang 1986).

Vodena leća je jednostavne građe, jedna biljka se naziva „frond“ ili članak (*Slika 2.*). Nalikuje duguljastim listićima, duljine do 1 cm, a čine ga reducirana stabljika i list, te jedan korijen duljine do 5 cm čije stanice sadrže kloroplaste, a uloga mu je održavanje biljke u vodoravnom položaju. Sa svake strane užeg dijela članka nalazi se reproduktivni džep unutar kojeg započinje proces vegetativnog razmnožavanja. Novonastale biljke–kćeri mogu neko vrijeme ostati spojene s matičnom biljkom čineći koloniju. Hranjive tvari primaju se preko donje površine plutajućeg članka (Vidaković–Cifrek 2007).



**Slika 2.** Mala vodena leća (*Lemna minor* L.)  
(preuzeto s <http://www.sciencephoto.com/media/16491/enlarge>)

Za potrebe laboratorijskih istraživanja biljke se uzgajaju na tekućoj hranjivoj podlozi u kontroliranim uvjetima temperature i osvjetljenja.

Svojstva zbog kojih je vodena leća pogodna za laboratorijska istraživanja su:

- jednostavna građa,
- brzo vegetativno razmnožavanje čime je osigurana genetska homogenost,
- lagan uzgoj na jeftinoj i jednostavnoj hranjivoj podlozi,
- mali prostor potreban za uzgoj,
- malih je dimenzija, ali istodobno je dovoljno velika da se neke promjene uzrokovane tvarima u hranjivoj podlozi mogu promatrati golim okom,
- velika osjetljivost na dodatak različitih tvari u hranjivu podlogu (Vidaković–Cifrek 2007, Wang 1986, Radić i Pevalek–Kozlina 2010, Scherr i sur. 2008).

Pri upotrebi vodene leće kao testnog organizma može se pratiti cijeli niz pokazatelja učinaka istraživanih tvari kao što su: prirast broja biljaka, preživljavanje, duljina korjenčića, ultrastrukturne promjene, prirast mase svježe tvari, udio suhe tvari, ukupna površina biljaka, odnos površine biljaka i mase svježe tvari, stopa disanja, fotosintetska aktivnost, sadržaj fotosintetskih pigmenata, količina proteina, aktivnost antioksidacijskih enzima i pojava stresnih proteina (Vidaković–Cifrek 2007).

U Lemna–testu pokazatelji toksičnosti koji se prate su najčešće: prirast broja biljaka, prirast mase svježe i suhe tvari, ukupna površina biljaka i koncentracija fotosintetskih pigmenata (Vidaković–Cifrek 2007).



## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Utjecaj teških metala na metabolizam i fiziološke procese u biljkama ne ovisi samo o njihovoj koncentraciji, već i o prisutnosti drugih elemenata. Između esencijalnih i neesencijalnih elemenata u ekosustavu postoje interakcije koje mogu biti aditivne, sinergističke ili antagonističke, što ovisi o njihovim koncentracijama, temperaturi i pH vrijednosti.

Biološki učinci pojedinih metala na različite vrste biljaka su poznati, dok je djelovanje kombinacija metala manje istraženo. Cilj istraživanja je bio utvrditi utjecaj dodatka cinka (50  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$ ) na oksidacijski stres uzrokovan kadmijem (10  $\mu\text{M}$ ) u maloj vodenoj leći (*Lemna minor* L.). U tu svrhu pratila sam rast biljaka, prisutnost proteina toplotnog stresa, količinu vodikovog peroksida, aktivnost lipoksigenaze te stupanj oksidacije proteina (mjeranjem količine karbonila) i lipidne peroksidacije (mjeranjem količine malondialdehida).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. UZGOJ VODENE LEĆE

Za uzgoj i razmnožavanje vodene leće koristila sam modificiranu hranidbenu podlogu po Pirsonu i Seidlu (1950) čiji je sastav prikazan u *Tablici 2*.

**Tablica 2.** Sastav modificirane hranidbene podloge po Pirsonu i Seidlu (1950)

MAKROELEMENTI	mg dm <sup>-3</sup>	mmol dm <sup>-3</sup>
KNO <sub>3</sub>	400	3,95
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200	1,47
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	300	1,21
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	804	5,46
MIKROELEMENTI	mg dm <sup>-3</sup>	mmol dm <sup>-3</sup>
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,3	0,0015
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,5	0,0081
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	18,6	0,049
Željezni citrat	5,0	0,02
ORGANSKI DODACI	g dm <sup>-3</sup>	mmol dm <sup>-3</sup>
Saharoza	10,0	29,2
Asparagin	0,1	0,66

Nakon što sam sve sastojke otopila u destiliranoj vodi, podesila sam pH vrijednost hranjive podloge na 4,5 koristeći otopinu kalijevog hidroksida koncentracije 0,1 M.

U svrhu praćenja učinaka cinka i kadmija na vodenu leću, te njihovog međudjelovanja, koristila sam dvije koncentracije cinka, te jednu koncentraciju kadmija, prilikom čega sam promatrala ukupno šest tretmana. U prva dva tretmana dodala sam samo cink (50 µM i 100 µM), a u druga dva kombinacije cinka (50 µM i 100 µM) i kadmija (10 µM). Vodenu leću, koju sam uzgajala bez dodataka metala u hranidbenoj podlozi, koristila sam kao negativnu kontrolu, a kao pozitivnu kontrolu

koristila sam hranidbenu podlogu s dodatkom 10  $\mu\text{M}$  kadmija. Prilikom pripreme podloge, ovisno o tretmanu, u hranjivu podlogu po Piersonu i Seidlu dodala sam odgovarajuće volumene matične otopine  $\text{ZnSO}_4$ , koncentracije 25 mM, i/ili  $\text{CdCl}_2 \times 2,5 \text{ H}_2\text{O}$ , koncentracije 10 mM.

Za potrebe praćenja rasta vodene leće, koristila sam Erlenmeyerove tikvice volumena 100 mL, koje sam punila sa 60 mL hranidbene podloge, dok sam za praćenje pokazatelja oksidacijskog stresa koristila Erlenmeyerove tikvice od 300 mL, punjene sa 150 mL podloge. Nakon toga, tikvice sam začepila vatom i aluminijskom folijom, te sterilizirala autoklaviranjem pri temperaturi od 121 °C i tlaku 0,15 MPa u trajanju od 20 minuta, zajedno s priborom potrebnim za presađivanje vodene leće (pincete i mikrobiološke ušice).

Vodenu leću sam presađivala iz sterilne matične kulture u laminaru (komori s horizontalnim strujanjem zraka). Kako bih odredila rast biljaka, u svaku sam tikvicu presadila po jednu koloniju s dvije do tri biljke, a za određivanje pokazatelja oksidacijskog stresa desetak kolonija. Za praćenje rasta koristila sam po devet replika po tretmanu, a za praćenje pokazatelja oksidacijskog stresa tri replike. Biljke su rasle u klima-komori u uvjetima dugog dana (16 sati osvjetljenja i 8 sati tame) uz rasvjetu fluorescentnih cijevi ( $90 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$ ) na temperaturi  $24 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2. ODREĐIVANJE PRIRASTA BROJA BILJAKA

Prirast broja biljaka određivala sam brojanjem biljaka prvog, trećeg, petog, sedmog, desetog, dvanaestog i četrnaestog dana. Pri tome sam brojala i najmanju biljku vidljivu golim okom. Dobivene podatke uvrstila sam u sljedeći izraz (Ensley i sur. 1994):

$$\text{prirast broja biljaka} = \frac{\text{broj biljaka } n - \text{tog dana} - \text{broj biljaka prvog dana}}{\text{broj biljaka prvog dana}}$$

$$n = 3, 5, 7, 10, 12, 14$$

### 3.3. ODREĐIVANJE POKAZATELJA OKSIDACIJSKOG STRESA

#### 3.3.1. PRIPREMA UZORAKA

Šestog i dvanaestog dana od nasađivanja izvagala sam po 100 mg biljnog tkiva, koje sam zatim ekstrahirala u 1 mL hladnog kalij–fosfatnog pufera (pH = 7,0) koncentracije 0,1 M (pripremljenog prema *Tablici 3.*) uz dodatak malo PVPa (polivinilpirolidon).

**Tablica 3.** Sastav 50 mL kalij–fosfatnog pufera koncentracije 0,1 M

1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,925 mL
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,075 mL
10 mM EDTA	500 µL
destilirana voda	do 50 mL

Dobivene ekstrakte centrifugirala sam na 15 000g u trajanju 30 minuta na temperaturi od +4 °C. Supernatanti dobiveni centrifugiranjem čuvani su na –20 °C.

#### 3.3.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VODIKOVOG PEROKSIDA

Uzorke svježeg biljnog materijala, mase 50 mg, homogenizirala sam u hladnom tarioniku u 1 mL hladnog acetona. Smjesu sam centrifugirala 3 minute na 1000g (+4 °C) s ciljem odstranjivanja krutog staničnog materijala. Potom sam dodala 400 µL titanovog sulfata i 500 µL koncentriranog amonijevog hidroksida. Nakon centrifugiranja (10 minuta na 10 000g pri +4 °C) dobiveni talog sam otopila u 1 mL 2 M sulfatne kiseline i ponovno centrifugirala 10 minuta na 10 000g. Apsorbanciju dobivenog supernatanta mjerila sam na 415 nm ( $\epsilon = 1,878 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Količina vodikovog peroksida određuje se posredno mjerenjem količine kompleksa titanovog peroksida, koji se taloži kada se biljnom ekstraktu doda titanov sulfat i amonijev hidroksid (Mukherjee i Choudhari 1983).

$$[H_2O_2] = \frac{A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \quad [\mu M/mL]$$

$$H_2O_2 / g = \frac{[H_2O_2]}{m(g) / 1 mL} \quad [\mu M/g_{st}]$$

$V_{r.s.}$  = volumen reakcijske smjese = 1 mL

F.R. = faktor razrjeđenja = 1

$V_{uzor.}$  = volumen uzorka = 1 mL

$\varepsilon$  = ekstinkcijski koeficijent =  $1,878 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$l$  = duljina optičkog puta = 1 cm

### 3.3.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA

Sadržaj malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, određivala sam miješanjem 400  $\mu\text{L}$  ranije pripremljenog ekstrakta i 800  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese (0,25%-tna tiobarbituratna kiselina (TBA) u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini (TCA)). Uzorke i slijepu probu (1,5 mL reakcijske smjese) potom sam zagrijavała u sušioniku na 95 °C tijekom 30 minuta. Nakon toga sam ih naglo ohladila stavljanjem na led te centrifugirala 10 minuta na 10 000g na +4 °C (Heath i Packer 1968). Supernatant sam koristila za mjerenje apsorbancije na 532 nm, te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje.

$$\Delta A = A_{532} - A_{600}$$

Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti, dolazi do raspadanja lipidnih peroksida, nastalih kao posljedica oksidacijskog stresa, pri čemu nastaje malondialdehid (MDA). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crveno obojenje koje se mjeri spektrofotometrijski.

Koncentraciju lipidnih peroksida izračunala sam prema Lambert–Beerovom zakonu i izrazila kao TBARS (eng. *thiobarbituratic acid reactive substances*) u jedinicama  $\text{nmol g}^{-1}$  svježeg tvari (uz ekstinkcijski koeficijent  $\varepsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$$dA = \frac{\Delta A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \quad [\mu M/mL]$$

$$TBARS / g = \frac{dA \times 1000}{m(g) / 1 mL} \quad [nM/g_{st}]$$

$V_{r.s.}$  = volumen reakcijske smjese = 1 mL

F.R. = faktor razrjeđenja = 1

$V_{uzor.}$  = volumen uzorka = 1 mL

$\varepsilon$  = ekstinkcijski koeficijent =  $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$l$  = duljina optičkog puta = 1 cm

### 3.3.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPOKSIGENAZE

Aktivnost lipoksigenaze određivala sam spektrofotometrijskim mjerenjem povećanja apsorbancije uzoraka, nastalog zbog stvaranja konjugiranih diena masnih kiselina, na valnoj duljini 234 nm (Axelrod i sur. 1981) uz ekstinkcijski koeficijent  $\varepsilon = 25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Aktivnost je izražena kao  $\mu\text{mol}$  produkta u minuti po miligramu proteina.

1 mL reakcijske smjese sadržavao je 0,25 mM linolne kiseline, 50 mM kalij-fosfatnoga pufera (pH 7,0) i 20  $\mu\text{L}$  ranije pripremljenog ekstrakta. Kao slijepu probu koristila sam 20  $\mu\text{L}$  ekstrakta pomiješanog s 50 mM kalij-fosfatnim puferom.

$$[LOX] = \frac{A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \quad [\mu\text{M/mL}]$$

$$LOX / g = \frac{[LOX] \times 1000}{m(g) / 1 mL} \quad [\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteina}]$$

$V_{r.s.}$  = volumen reakcijske smjese = 1 mL

F.R. = faktor razrjeđenja = 1

$V_{uzor.}$  = volumen uzorka = 1 mL

$\varepsilon$  = ekstinkcijski koeficijent =  $25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$l$  = duljina optičkog puta = 1 cm

### 3.3.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA KARBONILA

Sadržaj karbonilnih grupa proteina određivala sam spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije otopljenih uzoraka na valnoj duljini od 370 nm (Levine i sur. 1994).

200  $\mu\text{L}$  uzorka (ranije pripremljenog ekstrakta), koji sadrži najmanje 0,5 mg/mL proteina, pomiješala sam s 300  $\mu\text{L}$  10 mM otopine dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl. Kao slijepu probu koristila sam isti uzorak (200  $\mu\text{L}$ ) pomiješan s 2 M HCl (300  $\mu\text{L}$ ). Pripremljene uzorke inkubirala sam 1 sat na sobnoj temperaturi uz miješanje svakih 15 minuta. Nakon inkubacije slijedilo je taloženje proteina s 500  $\mu\text{L}$  10%-tne otopine trikloroctene kiseline (TCA) i hlađenje par minuta na temperaturi od  $-20^{\circ}\text{C}$ . Uzorke sam potom centrifugirala 10 minuta na 12 000g. Nakon toga isprala sam talog otopinom etanola i etilacetata u omjeru 1:1 (3 x 500  $\mu\text{L}$ ) kako bih uklonila nevezani reagens. Dobiveni talog sam otopila u 1 mL 6 M otopine uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) u ultrazvučnoj kupelji u trajanju oko 30 minuta.

Karbonilne grupe nastale oksidacijskim oštećenjem proteina reagiraju s DNPH pri čemu nastaju kiseli hidrazoni, koji apsorbiraju svjetlost valne duljine 370 nm. Oporavak proteina u svakom uzorku određivala sam mjerenjem apsorbancije na 280 nm. Od vrijednosti apsorbancije uzorka oduzela sam vrijednost apsorbancije pripadajuće slijepe probe i izračunala koncentraciju kiselih hidrazona, odnosno karbonila, prema Lambert–Beerovom zakonu, prilikom čega je ekstinkcijski koeficijent jednak  $\epsilon = 22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

$$[KARBONILI] = \frac{\Delta A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{M/mL}]$$

$$KARBONILI / g = \frac{[KARB] \times 1000}{m(g) / 1 \text{ mL}} \quad [\text{nM/g}_{\text{proteina}}]$$

$V_{r.s.}$  = volumen reakcijske smjese = 1 mL

$F.R.$  = faktor razrjeđenja = 1

$V_{uzor.}$  = volumen uzorka = 1 mL

$\epsilon$  = ekstinkcijski koeficijent =  $22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$l$  = duljina optičkog puta = 1 cm

### 3.3.6. ELEKTROFOREZA UKUPNIH TOPIVIH PROTEINA U DENATURIRAJUĆIM UVJETIMA

Ukupne topive proteine razdvajala sam *MINI-PROTEAN* (Bio-Rad) vertikalnom diskontinuiranom SDS-elektroforezom u poliakrilamidnom gelu uz dodatak elektrodnog pufera čiji je sastav prikazan u *Tablici 4.* (Laemmli 1970).

Natrijev dodecil sulfat–poliakrilamid gel elektroforeza (SDS–PAGE) je metoda kojom se proteini obrađuju SDS–om (eng. *sodium dodecyl sulfate*), čime se razmataju i ujednačuje im se površinski naboj, pa se mogu razdvajati u električnom polju samo na temelju molekularne mase.

Između dvije staklene ploče pripremila sam poliakrilamidni gel koji se sastojao od dva dijela, gornjeg gela za sabijanje i donjeg za razdvajanje, čiji su sastavi prikazani u *Tablici 5.*

**Tablica 4.** Sastav elektrodnog pufera koncentriranog 10 puta

ELEKTRODNI PUFER 1 L	
Tris	24 g
Glicin	114 g
SDS	10 g
6,0 M HCl	do pH 8,3
deH <sub>2</sub> O	do 1 L

Prije nego što sam dodala SDS, APS i TEMED iz otopine sam pomoću vakuuma stvorenog vodenom sisaljkom uklonila molekularni kisik, koji je inhibitor reakcije polimerizacije.

Na gel sam nanosila odgovarajuće volumene tako da je svaki uzorak sadržavao otprilike istu količinu proteina. Dodala sam pufer za obradu uzorka (*sample buffer*) koji je sadržavao 65 M pufer Tris–HCl (pH 6,8), 6%-tni SDS, 30%-tni glicerol, 6%-tni β–merkaptortanol i 0,01%-tnu boju brom–fenol modnilo za označavanje tijekom elektroforeze. Kao standard za određivanje molekularnih masa razdvojenih proteina, koristila sam *Prestained Protein Ladder* (Fermentas) koji sadrži čiste obojane proteine molekularnih masa od 10 do 170 kDa.



**Tablica 5.** Sastav gelova za sabijanje i razdvajanje prilikom elektroforeze u denaturirajućim uvjetima

	<b>GEL ZA SABIJANJE</b> 10 mL	<b>GEL ZA RAZDVAJANJE</b> 50 mL
deH <sub>2</sub> O	6,8 mL	20 mL
30% akrilamid/bisakrilamid	1,7 mL	16,6 mL
1,5 M Tris-HCl	2,5 mL (pH 6,8)	12,5 mL (pH 8,8)
10% SDS	0,1 mL	0,5 mL
10% APS	0,1 mL	0,5 mL
TEMED	0,01 mL	0,02 mL

Elektroforezu sam provodila pri temperaturi od +4 °C. Započela sam ju s naponom od 100 V, kako bi se uzorak koncentrirao u gelu za sabijanje. Nakon što je boja za obilježavanje došla do granice s gelom za razdvajanje, napon sam povišala na 200 V.

Prema prethodno opisanom postupku pripremila sam dva gela, prvi sam koristila za prijenos na membranu, a drugi za bojanje srebrom kako bi se vidio položaj proteina određenih imunodetekcijom.

### 3.3.6.1. BOJANJE GELA SREBROM

Bojanje srebrom je metoda kojom proteini razdvojeni elektroforezom postaju vidljivi u poliakrilamidnom gelu (Blum i sur. 1987).

Nakon završetka elektroforeze gel sam preko noći fiksirala u otopini 50%-tnog metanola i 12%-tne octene kiseline u koju sam dodala 0,5 mL 37%-tnog formaldehida (HCHO) na 1 L fiksativa. Nakon fiksiranja gel sam isprala u 30%-tnom etanolu (3 x 20 minuta) te inkubirala 1 minutu u otopini 0,805 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, a zatim ponovno isprala u deH<sub>2</sub>O (3 x 20 sekundi). Potom sam gel 20 minuta impregnirala u otopini 11,77 mM AgNO<sub>3</sub> i 37%-tnom formaldehidu te ponovo dva puta ispirala u deH<sub>2</sub>O (20 sekundi). Nakon ispiranja slijedilo je razvijanje u otopini koja je sadržavala 0,805 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2417 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O i 37%-tni formaldehid dok se nisu pojavile vrpce koje predstavljaju položaj proteina u gelu.

Razvijanje sam zaustavila otopinom koja je sadržavala 50%-tni metanol i 12%-tnu octenu kiselinu (5 do 10 minuta).

### 3.3.6.2. PRIJENOS PROTEINA NA MEMBRANU I IMUNODETEKCIJA

Nakon elektroforeze razdvojene proteine sam prenijela na nitroceluloznu membranu s veličinom pora od 0,45  $\mu\text{m}$  metodom „*Western blotting*“. Za prijenos sam koristila uređaj *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad). Prijenos je trajao 60 minuta pod stalnim naponom od 60 V, uz dodatak pufera za prijenos (pH 8,3) koji se sastojao od 25 mM Tris, 192 mM glicina i 10%-tnog metanola.

Nakon prijenosa, membranu sam 15 minuta fiksirala u otopini 10%-tne octene kiseline i 25%-tnog propanola, a zatim sam ju nekoliko puta ispirala destiliranom vodom. Provjeru uspješnosti prijenosa napravila sam neselektivnim bojanjem proteina s Ponceau Rouge S bojom (0,1%-tni Ponceau Rouge S u 5%-tnoj octenoj kiselini). Potom sam membranu ponovno nekoliko puta ispirala do obezbojenja s fosfatnim puferom PBS (pH 7,4) koji je sadržavao 0,58 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,17 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  x  $\text{H}_2\text{O}$  i 0,68 M NaCl. Prije imunodetekcije, membrana s proteinima je blokirana u 5%-tnoj otopini nemasnog mlijeka u prahu u TPBS puferu (fosfatni pufer uz dodatak 1%-tnog Tween 20), a nakon toga sam ju tri puta ispirala istim puferom (5 minuta).

Nakon ispiranja, membrane sam preko noći inkubirala s primarnim antitijelima (anti-HSP70) u odgovarajućem razrjeđenju (1:1000), na temperaturi od +4 °C. Idući dan, membrane sam tri puta ispirala s TPBS puferom (5 minuta) i nakon toga inkubirala jedan sat sa sekundarnim antitijelima (*antirabbit IgG*) u razrjeđenju 1:2000. Nakon ponovnog ispiranja TPBS puferom (3 x 5 minuta) slijedila je vizualizacija u otopini BCIP/NBT (5-bromo-4 kloro-3-indolilfosfat/nitrotetrazolium modriilo, Sigma). Proces sam izvodila u tami zbog osjetljivosti supstrata na svjetlost, a zaustavila sam ga uranjanjem membrane u veću količinu destilirane vode.

### 3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost odgovarajućeg broja replika (devet replika prilikom praćenja prirasta biljaka, odnosno tri replike prilikom praćenja pokazatelja oksidacijskog stresa)  $\pm$  standardna devijacija. Dobivene rezultate sam analizirala pomoću jednosmjernog ANOVA testa (*The Analysis Of Variance*) nakon čega je slijedio *Duncun New Multiple Range Test* (DNMRT) uz upotrebu programa *STATISTICA 7.1.* (*StatSoft*, USA). Rezultati su smatrani značajnim ako je  $P < 0,05$ . Grafovi su nacrtani u programu Microsoft Excel, programskog paketa Microsoft Office.

## 4. REZULTATI

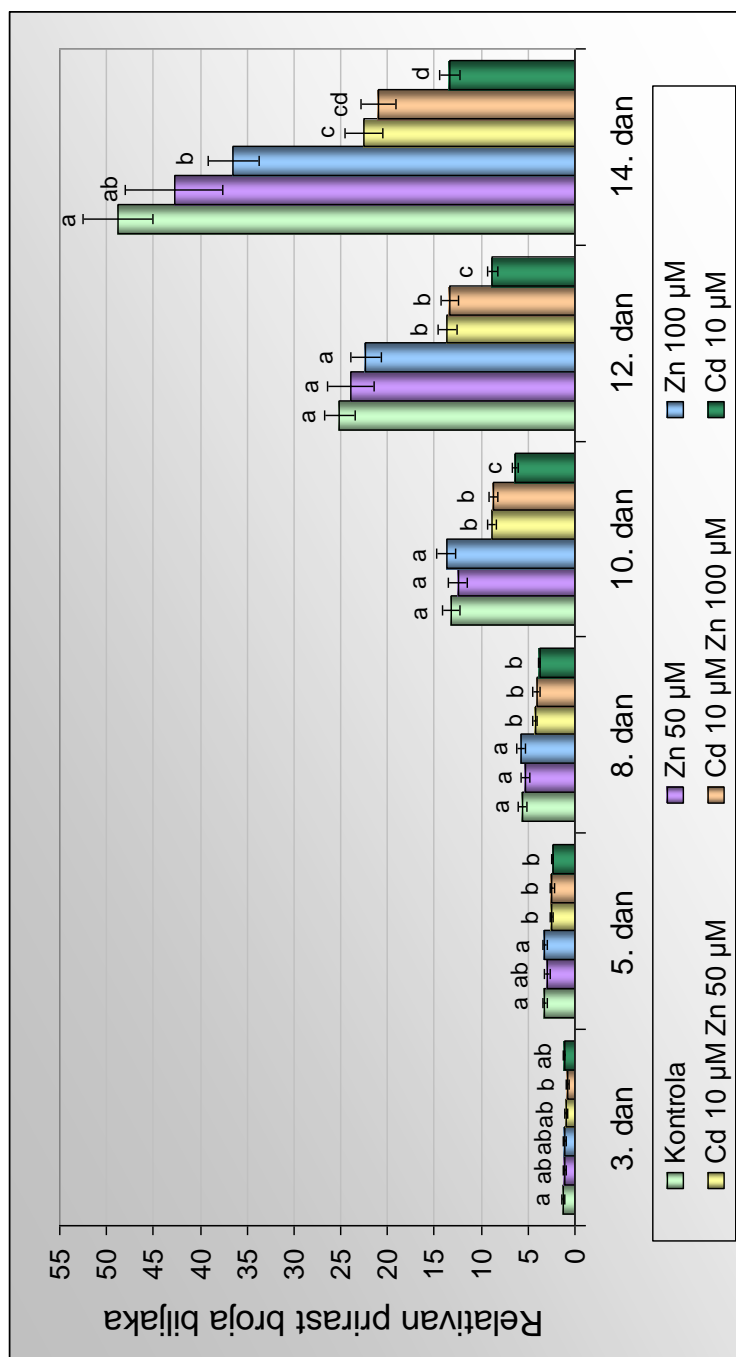
### 4.1. PRIRAST BROJA BILJAKA

Učinak različitih koncentracija cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ), kadmija (10  $\mu\text{M}$ ) te njihove kombinacije na rast vodene leće pratila sam određivanjem prirasta biljaka u periodu od 14 dana (*Slika 3.*). Trećeg dana pokusa nije bilo statistički značajne razlike ( $P < 0,05$ ) u prirastu vodene leće koju sam uzgajala na hranjivoj podlozi s dodatkom cinka i/ili kadmija u odnosu na kontrolu. Izuzetak predstavlja smanjeni prirast kod biljaka uzgajanih na podlozi u kojoj je bila prisutna kombinacija 10  $\mu\text{M}$  kadmija i 100  $\mu\text{M}$  cinka.

Od petog dana, pa sve do završetka pokusa, vidljivo je značajno smanjenje u prirastu biljaka koje sam uzgajala s dodatkom 10  $\mu\text{M}$  kadmija (zasebno ili u kombinaciji s različitim koncentracijama cinka), u odnosu na kontrolu i biljke na podlogama s cinkom.

Od desetog dana pokusa uočljiv je značajni porast prirasta vodene leće uzgajane na podlogama u kojima su bile prisutne kombinacije 10  $\mu\text{M}$  kadmija i cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) u odnosu na biljke koje su rasle na podlozi u kojoj je bio prisutan samo kadmij, a za koje je zabilježen najmanji prirast.

Četrnaestog dana pokusa najveći je prirast bio kod kontrolnih biljaka te biljaka koje su rasle na podlozi s 50  $\mu\text{M}$  cinkom, dok je u odnosu na njih, kod biljaka koje su imale u hranjivoj podlozi 100  $\mu\text{M}$  cink prirast smanjen.

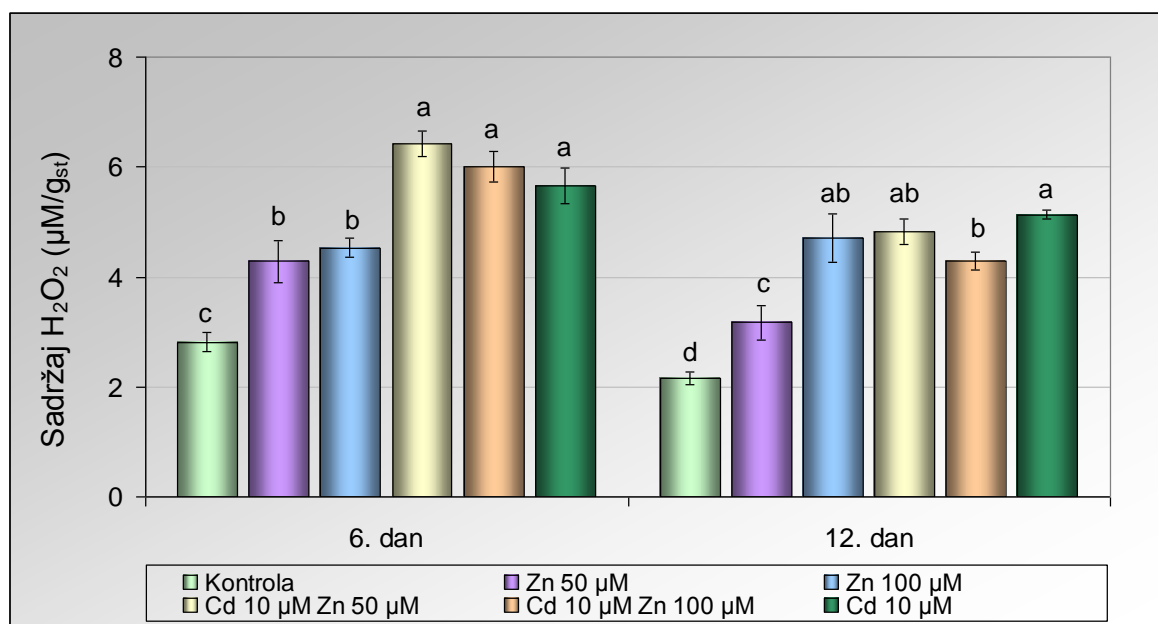


**Slika 3.** Učinak kadmija (10 µM), cinka (50 i 100 µM) i njihove kombinacije na prirast vodene leće (*Lemna minor*) 3., 5., 8., 10., 12. i 14. dana uzgoja. Različita slova, unutar istog dana, pokazuju statistički značajnu razliku između tretmana ( $P < 0,05$ , ANOVA, DNMR). Na stupcima je prikazana standardna devijacija.

## 4.2. SADRŽAJ VODIKOVOG PEROKSIDA

U vodenoj leći na hranjivoj podlozi s dodacima različitih koncentracija cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) i/ili kadmija (10  $\mu\text{M}$ ) šestog dana istraživanja izmjeren je statistički značajan porast sadržaja vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) u odnosu na kontrole biljke. Između biljaka uzgajanih samo s dodatkom 10  $\mu\text{M}$  kadmija i biljaka uzgajanih s kombinacijama kadmija i cinka nije izmjerena statistički značajna razlika u sadržaju  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Slika 4.).

Dvanaestog dana je i dalje bio uočljiv značajan porast sadržaja  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod svih biljaka u odnosu na kontrole biljke. Kombinirani tretman (100  $\mu\text{M}$  Zn i 10  $\mu\text{M}$  Cd) uzrokovao je kod biljaka statistički značajno smanjenje u sadržaju  $\text{H}_2\text{O}_2$  u odnosu na biljke uzgajane samo s kadmijem. Isto tako, postoji značajno smanjenje sadržaja  $\text{H}_2\text{O}_2$  kod biljaka uzgajanih samo s 50  $\mu\text{M}$  cinkom, u odnosu na biljke kojima je dodan 100  $\mu\text{M}$  cink.

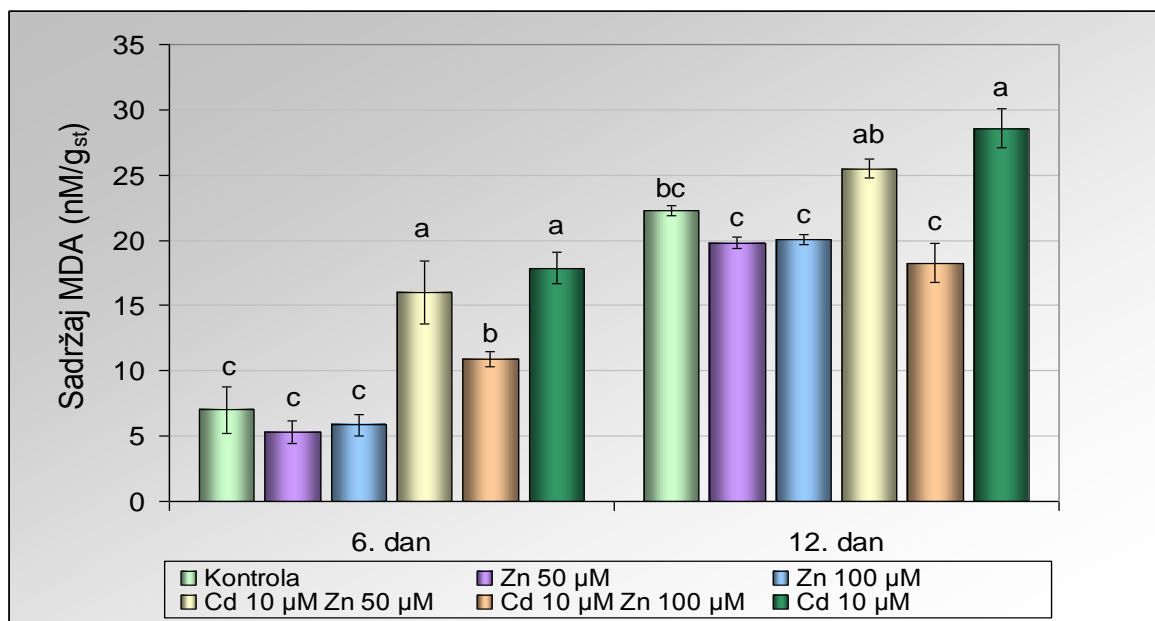


**Slika 4.** Učinak kadmija (10  $\mu\text{M}$ ), cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) i njihove kombinacije na sadržaj vodikovog peroksida u vodenoj leći (*Lemna minor*) nakon šest i dvanaest dana tretmana. Različita slova, unutar istog dana, pokazuju statistički značajnu razliku između tretmana ( $P < 0,05$ , ANOVA, DNMRT). Na stupcima je prikazana standardna devijacija.

### 4.3. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA

Šestog dana pokusa najveći je sadržaj malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, zabilježen kod biljaka uzgajanih na hranjivoj podlozi s dodatkom 10  $\mu\text{M}$  kadmija i kombinacije 50  $\mu\text{M}$  cinka i kadmija. U odnosu na njih, kod biljaka uzgajanih na podlozi s 100  $\mu\text{M}$  cinkom i kadmijem, sadržaj MDA je bio smanjen. Najmanja koncentracija zabilježena je kod kontrolnih biljaka i biljaka uzgajanih na hranjivim podlogama u kojima su bile prisutne različite koncentracije cinka (Slika 5.).

Dvanaestog dana sadržaj MDA bio je smanjen kod biljaka uzgajanih na podlozi s kombinacijom 100  $\mu\text{M}$  cinka i 10  $\mu\text{M}$  kadmija u odnosu na biljke koje su bile uzgajane na podlozi s kombinacijom 50  $\mu\text{M}$  cinka i kadmija i biljke kojima je bio dodan samo kadmij. Isto tako, ne postoji značajna razlika u sadržaju MDA u biljaka tretiranih kombinacijom cinka (100  $\mu\text{M}$ ) i kadmija, u odnosu na kontrolu i biljke tretirane samo s cinkom.

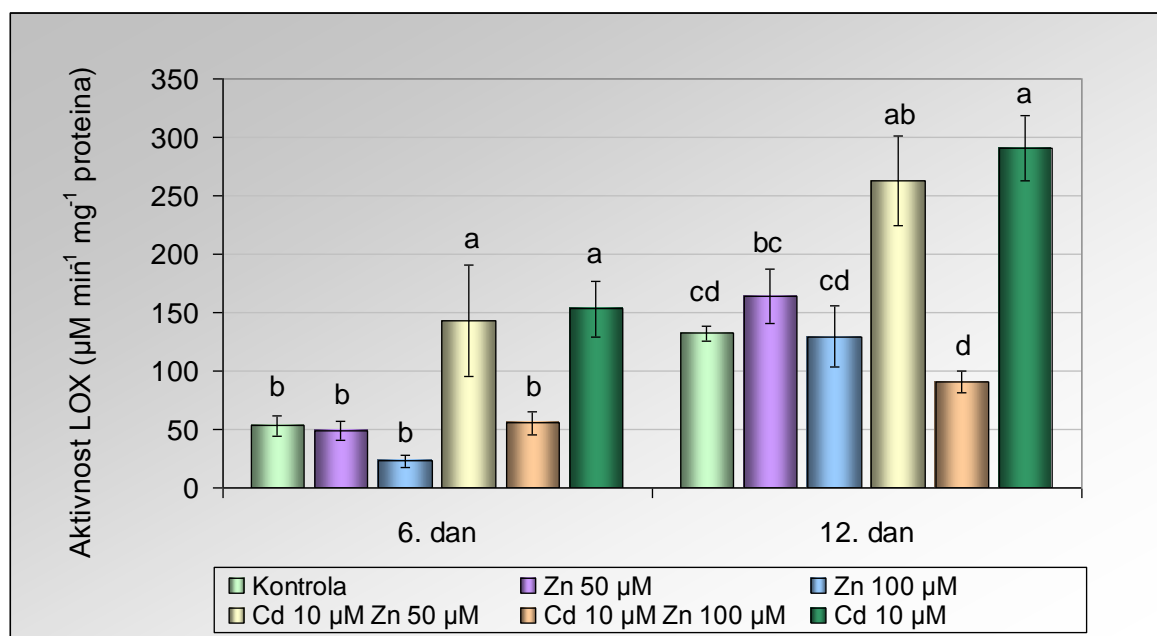


**Slika 5.** Učinak kadmija (10  $\mu\text{M}$ ), cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) i njihove kombinacije na sadržaj malondialdehida (produkta lipidne peroksidacije) u vodenoj leći (*Lemna minor*) šestog i dvanaestog dana uzgoja. Različita slova, unutar istog dana, pokazuju statistički značajnu razliku između tretmana ( $P < 0,05$ , ANOVA, DNMR). Na stupcima je prikazana standardna devijacija.

#### 4.4. AKTIVNOST LIPOKSIGENAZE

Šestog dana pokusa najviša aktivnost lipoksigenaze (LOX) uočena je kod biljaka uzgajanih s dodatkom čistog kadmija i kombinacije 50  $\mu\text{M}$  cinka i kadmija (*Slika 6.*). U odnosu na njih aktivnost LOX kod biljaka tretiranih s kombinacijom 100  $\mu\text{M}$  cinka i kadmija bila je smanjena, te je bila slična aktivnosti LOX u kontrolnim biljkama i biljkama kojima je bio dodan samo cink (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ).

Dvanaestog dana došlo je do porasta aktivnosti LOX kod biljaka uzgajanih s dodatkom 50  $\mu\text{M}$  cinka u odnosu na kontrolne biljke i biljke tretirane s 100  $\mu\text{M}$  cinkom. U slučaju zajedničkog djelovanja 100  $\mu\text{M}$  cinka i kadmija, aktivnost LOX je bila slična aktivnosti LOX koja je bila prisutna kod kontrolnih biljaka te biljaka uzgajanih samo s 100  $\mu\text{M}$  cinkom.



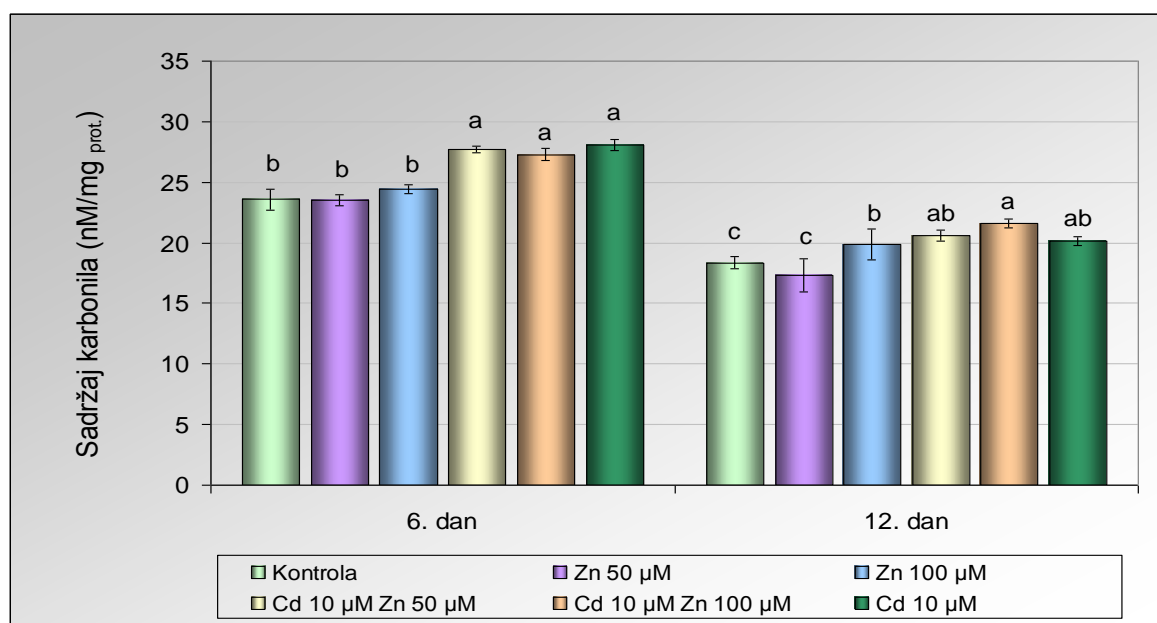
**Slika 6.** Učinak kadmija (10  $\mu\text{M}$ ), cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) i njihove kombinacije na aktivnost lipoksigenaze u vodenoj leći (*Lemna minor*) šestog i dvanaestog dana uzgoja. Različita slova, unutar istog dana, pokazuju statistički značajnu razliku između tretmana ( $P < 0,05$ , ANOVA, DNMRT). Na stupcima je prikazana standardna devijacija.



## 4.5. SADRŽAJ KARBONILA

Šestog i dvanaestog dana pokusa vidljivo je statistički značajno povišenje sadržaja karbonila u biljaka uzgajanih na hranjivim podlogama s dodatkom kadmija (dodanog zasebno ili u kombinaciji s cinkom), u odnosu na kontrolne biljke i biljke uzgajane uz dodatak samo cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) (Slika 7.).

Osim u spomenutim tretmanima, dvanaestog dana došlo je do porasta sadržaja karbonila i kod biljaka uzgajanih s dodatkom 100  $\mu\text{M}$  cinka.

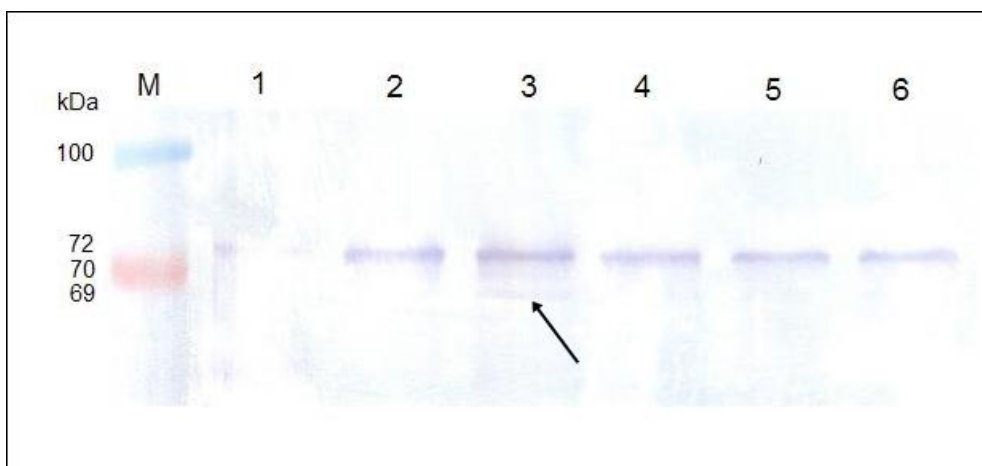


**Slika 7.** Učinak kadmija (10  $\mu\text{M}$ ), cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) i njihove kombinacije na sadržaj karbonila u vodenoj leći (*Lemna minor*) šestog i dvanaestog dana uzgoja. Različita slova, unutar istog dana, pokazuju statistički značajnu razliku između tretmana ( $P < 0,05$ , ANOVA, DNMRT). Na stupcima je prikazana standardna devijacija.

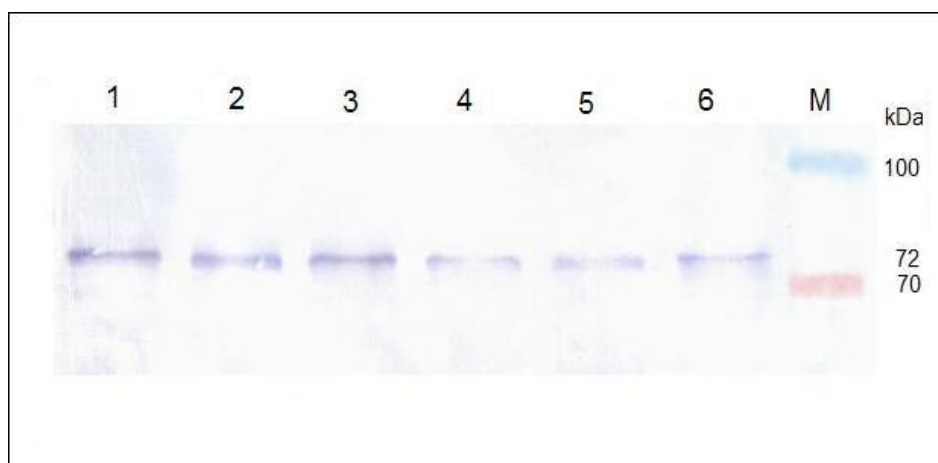
## 4.6. PROTEINI TOPLLOTNOG STRESA

Imunodetekcija proteina na membrani (*Western* analiza) nakon šestog dana pokusa ukazuje na prisutnost izoforme HSP70, mase ~72 kDa, kod svih tretmana uključujući i kontrolu (*Slika 8.*). Slabije izražena vrpca uočena kod kontrole rezultat je manje količine nanesenih proteina, što je potvrdio odgovarajući gel obojen srebrnim nitratom, na koji je nanesena ista količina uzoraka kao i na gel koji je korišten za prijenos proteina na nitroceluloznu membranu. U ekstraktima biljaka tretiranim kombinacijom 10  $\mu$ M kadmija i 100  $\mu$ M cinka (uzorak broj 3) bila je prisutna dodatna izoforma HSP70, mase ~69 kDa.

Nakon dvanaestog dana pokusa bila je kod svih ekstrakata vidljiva jedna izoforma HSP70, molekularne mase ~72 kDa (*Slika 9.*).



**Slika 8.** Imunodetekcija HSP70 na nitroceluloznoj membrani uz primjenu specifičnih antitijela. Za ekstrakciju proteina su korištene biljke nakon šest dana tretmana. 1–kontrola, 2–Zn50, 3 i 4–Cd10 Zn100, 5–Zn100, 6–Cd10, M–marker molekularnih masa. Strelicom je obilježena dodatna izoforma HSP70 mase 69 kDa.



**Slika 9.** Imunodetekcija HSP70 na nitroceluloznoj membrani uz primjenu specifičnih antitijela. Za ekstrakciju proteina su korištene biljke nakon dvanaest dana tretmana. 1–kontrola, 2–Cd10 Zn100, 3–Zn100, 4–Zn50, 5–Cd10, 6–Cd10 Zn50, M–marker molekularnih masa.

## 5. RASPRAVA

U okolišu je često prisutno više metala u potencijalno toksičnoj koncentraciji, a njihov učinak na biljke može biti sinergistički, aditivni ili antagonistički (Aravind i Prasad 2005). Hipoteza o elementima sa sličnim fizikalnim i kemijskim svojstvima pretpostavlja da će oni u živim sustavima djelovati antagonistički (Das i sur. 1997). Kadmij i cink pripadaju istoj skupini u periodnom sustavu elemenata, a zbog slične elektronske konfiguracije imaju slična kemijska i fizikalna svojstva (Aravind i Prasad 2004). Često su prisutni zajedno u okolišu (Hassan i sur. 2005). Poznavanje interakcija esencijalnih i neesencijalnih elemenata pomaže u analizi i shvaćanju obrane biljaka koje nastanjuju okoliš koji često sadrži kombinacije različitih toksičnih elemenata (Balen i sur. 2011).

Najmanji prirast bio je kod biljaka tretiranih s 10  $\mu\text{M}$  kadmijem. Slično smanjenje u prirastu vodene leće uočili su i drugi istraživači prilikom primjene različitih koncentracija kadmija (Khellaf i Zerdaoui 2009, Razinger i sur. 2008, Tukaj i sur. 2011, Tkalec i sur. 2008), a smanjenje prirasta uočeno je i kod drugih biljnih vrsta kao što su bor *Pinus sylvestris* (Schützendübel i sur. 2001), grah *Phaseolus vulgaris* (Chaoui i sur. 1997a, Ouariti i sur. 1997), grašak *Pisum sativum* (Sandalio i sur. 2001), ječam *Hordeum vulgare* (Wu i Zhang 2002), mrkva *Daucus carota* (Abou Auda i Ali 2010), rajčica *Lycopersicon esculentum* (Ouariti i sur. 1997, Cherif i sur. 2011), riža *Oryza sativa* (Hassan i sur. 2005) soja *Glycine max* (Muñoz i sur. 2008), suncokret *Helianthus annuus* (Hatata i Abdel-Aal 2008) i zlatni grah *Vigna radiata* (Kumari i sur. 2011).

Učinak kadmija na smanjenje prirasta biljaka može se objasniti njegovim utjecajem na metaboličke procese nakon ulaska u stanice. On djeluje na organske molekule i komplekse u citosolu te na stanične organele. Inhibira mitozu, smanjuje sintezu komponenata stanične stijenke, oštećuje Golgijev aparat uz istovremenu promjenu metabolizma polisaharida. Također potiče lignifikaciju staničnih stijenki, čime se povećava njihova rigidnost, a smanjuje produžni rast stanica (Pál i sur. 2006). Negativan utjecaj kadmija na rast također je posljedica i inhibicije fotosinteze.

U nekoliko istraživanja je potvrđeno da uz oštećenje ultrastrukture kloroplasta, kadmij smanjuje i sintezu klorofila *a* i *b*, te karotenoida uz istovremeno poticanje njihove razgradnje (Cherif i sur. 2011, Sandalio i sur. 2001, Benavides i sur. 2005,

Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999, Tkalec i sur. 2008). Smanjena količina fotosintetskih pigmenata negativno djeluje na stopu fotosinteze što za posljedicu ima smanjeni rast biljaka. Nadalje, smanjena količina karotenoida dovodi do njihove smanjene učinkovitosti kao zaštitnih pigmenata. Budući da karotenoidi u uvjetima visokih intenziteta svjetlosti preuzimaju ekscitacijsku energiju elektrona od tripletnog klorofila, njihovom smanjenom sintezom povećava se stvaranje ROS (Aravind i Prasad 2004). Djelovanjem ROS dolazi do inaktiviranja enzima i oštećenja važnih staničnih komponenata poput molekula DNA i proteina, što također smanjuje rast (Apel i Hirt 2004, Schützendübel i Polle 2002). Kadmij utječe i na enzime Calvinovog ciklusa, smanjujući učinkovitost fotosinteze, odnosno fiksaciju CO<sub>2</sub> i nastanak ugljikohidrata. Kadmij potiče i zatvaranje puči, nakon čega se osim smanjene transpiracije pojavljuje i smanjena difuzija CO<sub>2</sub>, što također indirektno negativno utječe i na sekundarne reakcije fotosinteze. Osim na fotosintezu, kadmij negativno utječe i na stanično disanje, a kao posljedica javlja se smanjena sinteza ATPa te brojnih intermedijera potrebnih za druge biosintetske puteve (Sandalio i sur. 2001, Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999, Benavides i sur. 2005). Kadmij također inhibira sintezu RNA i proteina, kao i aktivnost ribonukleaza (Hassan i sur. 2005, Hasan i sur. 2009). Veže se na sulfhidrilne grupe proteina čime inducira stvaranje disulfidnih veza, što dovodi do konformacijskih promjena, a time i promjene funkcija različitih proteina, kao što su npr. membranskih ionski kanali. Promjena funkcije membranskih ionskih kanala može dovesti do povećane propusnosti membrana te gubitka iona (Aravind i Prasad 2003). Pojavljuje se i promjena primanja esencijalnih elemenata kao što su kalcij, magnezij, željezo, fosfor, kalij i cink, što također može biti posljedica smanjenog stvaranja ATPa u procesu staničnog disanja, a koji je potreban za aktivni prijenos (Das i sur. 1997, Razinger i sur. 2008). Inhibicija željezo (II) reduktaze u korijenu, inducirana kadmijem, dovodi do nedostatka željeza što također negativno utječe na fotosintezu (Hasan i sur. 2009).

Suprotno rezultatima dobivenim tretmanom kadmijem, biljke uzgajane s dodatkom 50 µM cinka nisu imale smanjeni prirast, dok je kod biljaka tretiranih sa 100 µM cinkom prirast smanjen tek četrnaestog dana pokusa, ali je i dalje bio veći u odnosu na prirast biljaka na hranjivim podlogama kojima je dodan kadmij u koncentraciji 10 µM. Slični rezultati primijećeni su kod graha *Phaseolus vulgaris* gdje prilikom primjene 10 µM cinka nije došlo do smanjenja prirasta, dok je pri

koncentraciji cinka od 25  $\mu\text{M}$  prirast bio smanjen (Chaoui i sur. 1997a). Kod rajčice *Lycopersicon esculentum* su Cherif i sur. (2011) u prisutnosti viših koncentracija cinka (100 i 150  $\mu\text{M}$ ) uočili smanjenje prirasta, uz istovremenu pojavu kloroze i nekroze.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da cink, iako je esencijalan element potreban za rast i provođenje mnogih metabolički važnih procesa, kao što su metabolizam dušika i ugljikohidrata, fotosinteza, sinteza auksina i proteina (Ozdener i Aydin 2010, Broadley i sur. 2007, Kumari i sur. 2011), u višim koncentracijama može djelovati toksično inducirajući oksidacijski stres (Rout i Das 2003, Cherif i sur. 2011, Hall 2002 Aravind i Prasad 2005). Divalentni kationi, kao što su cinkovi ioni, zamjenjuju ione magnezija u procesu aktivacije enzima RUBISCO (ribuloza–1,5–difosfat–karboksilaza–oksigenaza), čime mu smanjuju aktivnost. Istovremeno NADPH, nastao u primarnim reakcijama fotosinteze, umjesto da se koristi u procesu fiksacije  $\text{CO}_2$ , reducira kisik uz nastajanje superoksidnog radikala (Tewari i sur. 2008). Cink u suvišku inaktivira i enzime vežući se na njihove cisteinske ostatke (Schützendübel i Polle 2002).

Biljke izložene kombiniranim tretmanima kadmija i cinka imale su od desetog dana pokusa veći prirast u odnosu na biljke tretirane samo s kadmijem, ali manji u odnosu na kontrolu i biljke kojima je bio dodan samo cink. Slične rezultate dobili su Wu i Zhang (2002) prilikom istraživanja djelovanja 300  $\mu\text{M}$  cinka i različitih koncentracija kadmija na ječam *Hordeum vulgare*, gdje je u biljaka izloženih kombinaciji kadmija i cinka došlo do porasta biomase u odnosu na one koje su tretirane samo s kadmijem. Kod riže *Oryza sativa* izložene kombiniranim tretmanima kadmija i cinka uočen je porast biomase u odnosu na biljke kojima je u hranjivu podlogu bio dodan samo kadmij (Hassan i sur. 2005). Cherif i sur. (2011) su kod rajčice *Lycopersicon esculentum* uočili porast biomase i ublažavanje toksičnosti kadmija kada je u hranjivoj podlozi bio prisutan cink u manjim koncentracijama (10 i 50  $\mu\text{M}$ ), a sinergistički učinak kada je koncentracija cinka bila viša (100 i 150  $\mu\text{M}$ ). Suprotne rezultate dobili su Chaoui i sur. (1997a) prilikom istraživanja utjecaja kombinacije cinka (10 i 25  $\mu\text{M}$ ) i kadmija (2 i 5  $\mu\text{M}$ ) na četrnaest dana stare sijance graha *Phaseolus vulgaris*. Pri tome su došli do zaključka da kadmij i cink imaju sinergistički i aditivni učinak.

Kadmij uzrokuje oksidacijski stres, ali ne sudjeluje direktno u stvaranju ROS putem Haber–Weissove reakcije (Shanker 2008, Benavides i sur. 2005). Uzrokuje stvaranje ROS potičući oksidaciju NADPH, što dovodi do nastanka superoksidnog radikala (Aravind i Prasad 2003). Razina ROS također može biti povećana inhibicijom antioksidacijskih enzima kao što su SOD, CAT, GR i peroksidaze. Aktivnost antioksidacijskih enzima kod stresa uzrokovanog kadmijem mijenja se ovisno o biljnoj vrsti i tkivu. Ovisno o koncentraciji, kadmij može inhibirati ili stimulirati aktivnost nekoliko antioksidacijskih enzima prije pojave vidljivih simptoma toksičnosti. Cherif i sur. (2011) su primijetili da je pri tretmanu kadmijem kod rajčice *Lycopersicon esculentum* aktivnost enzima CAT, APX i GR bila smanjena, dok je aktivnost SOD bila povišena uz istovremeno povećanje sadržaja  $H_2O_2$ . Smanjenje aktivnosti CAT uočeno je kod graha (Chaoui i sur. 1997b), dok je kod graška *Pisum sativum* osim smanjene aktivnosti CAT, primijećena i smanjena aktivnost SOD (Sandalio i sur. 2001).

Kao pokazatelje oksidacijskog stresa pratila sam količinu vodikovog peroksida, sadržaj malondialehida i karbonila, aktivnost lipoksigenaze te prisutnost proteina toplotnog stresa.

Sadržaj vodikovog peroksida bio je najviši u biljaka tretiranih s 10  $\mu M$  kadmijem. Dobiveni rezultati u kojima je nakon tretmana kadmijem izmjerena veća količina  $H_2O_2$  u skladu su s dosadašnjim istraživanjima i na drugim biljnim vrstama (Aravind i Prasad 2005, Hatata i Abdel–Aal 2008, Muñoz i sur. 2008, Rodríguez-Serrano i sur. 2009, Zhao i sur. 2005, Tkalec i sur. 2008). Nakupljanje  $H_2O_2$  u korijenu bora bilo je povezano s indukcijom aktivnosti SOD uz istovremenu inaktivaciju sustava uključenih u njegovo uklanjanje kao što su CAT, GR i APX (Schützendübel i sur. 2001).  $H_2O_2$  ima ulogu prijenosa signala prilikom indukcije obrambenih mehanizama kod stresa uzrokovanog različitim abiotičkim i biotičkim faktorima (Apel and Hirt, 2004, Romero-Puertas i sur. 2004). Sudjeluje i kao signalna molekula u zatvaranju puči pri djelovanju ABA, te u geotropizmu kojeg regulira auksin, a može i aktivirati kalcijeve kanale u plazmatskoj membrani, potaknuti sekundarni metabolizam i strukturne promjene kao što je ulaganje lignina, te staničnu smrt (Schützendübel i sur. 2001). Povećanje sadržaja  $H_2O_2$  u peroksisomima ili drugim staničnim kompartmentima može dovesti do promjene ekspresije gena koji kodiraju proteine uključene u odgovor na prisutnost kadmija (Romero-Puertas i sur. 2004). Pretpostavlja se da je ekspresija

1–2 % gena u vrsti *Arabidopsis thaliana* ovisna o  $H_2O_2$ . Neki od ovih gena kodiraju antioksidacijske enzime, dok drugi kodiraju proteine uključene u prijenos signala, kao što su kalmodulin, proteinske kinaze, te transkripcijske faktore (Neill i sur. 2002).

Cink je također prouzročio povišenje sadržaja  $H_2O_2$ , posebno kada je bio prisutan u koncentraciji 100  $\mu M$ . Dvanaestog dana tretmana sadržaj  $H_2O_2$  je bio podjednak sadržaju u biljkama tretiranim s 10  $\mu M$  kadmijem. Povišenje razine  $H_2O_2$  bilo je izmjereno i kod bijelog duda *Morus alba* prilikom primjena viših koncentracija cinka (Tewari i sur. 2008).

U biljaka izloženih kombiniranom tretmanu (100  $\mu M$  cinka i 10  $\mu M$  kadmija) izmjeren je dvanaestog dana pokusa manji sadržaj  $H_2O_2$ , u odnosu na biljke koje su bile tretirane samo s 10  $\mu M$  kadmijem. U vodenoj biljci *Ceratophyllum demersum* prilikom primjene kombiniranih tretmana 10  $\mu M$  kadmija i cinka (10, 50, 100 i 200  $\mu M$ ) dokazano je smanjenje sadržaja  $H_2O_2$ . Istovremeno kada je bio prisutan samo cink, u istim koncentracijama, nije došlo do povišenja sadržaja  $H_2O_2$  u odnosu na kontrolu (Aravind i Prasad 2005).

Teški metali putem djelovanja ROS uzrokuju lipidnu peroksidaciju prilikom čega se uklanja vodik iz nezasićenih masnih kiselina uz stvaranje lipidnih radikala. To dovodi do niza reakcija čiji je rezultat gubitak strukture membrane (Aravind i Prasad 2003). Sadržaj MDA, koji ukazuje na oštećenje membrana, bio je u odnosu na kontrolne biljke povišen kod biljaka tretiranih s 10  $\mu M$  kadmijem, što ukazuje na oksidacijski stres. Rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima provedenim na drugim biljnim vrstama (Wu i Zhang 2002, Cherif i sur. 2011, Aravind i Prasad 2005, Sandalio i sur. 2001, Hassan i sur. 2005, Muñoz i sur. 2008, Chaoui i sur. 1997b). Tretman cinkom, u odnosu na kontrolne biljke, nije uzrokovao povišenje sadržaja MDA u biljkama. Kod biljaka tretiranih s kombinacijom metala, 100  $\mu M$  cinka i 10  $\mu M$  kadmija, u odnosu na čisti kadmij, bilo je prisutno smanjenje sadržaja MDA već šestog dana pokusa, a dvanaestog dana pokusa sadržaj je bio podjednak sadržaju MDA u kontroli. Kod primjene kombiniranog tretmana – 50  $\mu M$  cinka i 10  $\mu M$  kadmija u biljkama se sadržaj MDA nije smanjio u odnosu na biljke tretirane samo s 10  $\mu M$  kadmijem. Smanjenje sadržaja MDA, ovisno o koncentraciji cinka primijetili su i drugi istraživači. Kod riže je sadržaj MDA bio manji nakon tretmana u kojima su zajedno bili prisutni kadmij i cink, u odnosu na sadržaj MDA kod biljaka tretiranih samo s kadmijem (Hassan i sur. 2005). Balen i sur. (2011) su u vodenoj leći *Lemna minor*



također zapazili povišenje sadržaja MDA nakon tretmana s 5  $\mu\text{M}$  kadmijem. No povišenje sadržaja MDA zapazili su sedmog dana i kod obje primijenjene koncentracije cinka (25 i 50  $\mu\text{M}$ ), dok su kod kombiniranih tretmana kadmija i cinka obje koncentracije cinka (25 i 50  $\mu\text{M}$ ) dovele do sniženja sadržaja MDA. S druge strane, Aravind i Prasad (2005), prilikom primjene različitih koncentracija cinka kod vodene biljke *Ceratophyllum demersum*, niti kod najviše koncentracije (200  $\mu\text{M}$ ) nisu dokazali porast sadržaja MDA, ali su nakon primjene 10  $\mu\text{M}$  kadmija i različitih koncentracija cinka uočili smanjenje sadržaja MDA u odnosu na biljke koje su bile izložene samo kadmiju. Cherif i sur. (2011) su kod rajčice primijetili povišenje sadržaja MDA prilikom primjena viših koncentracija cinka (100 i 150  $\mu\text{M}$ ), no ono nije bilo prisutno u biljkama nakon tretmana s nižim koncentracijama cinka (10 i 50  $\mu\text{M}$ ). Primijetili su smanjenje sadržaja MDA nakon primjene kombiniranih tretmana 10  $\mu\text{M}$  kadmija i nižih koncentracija cinka (10 i 50  $\mu\text{M}$ ), dok je nakon primjene kombinacije viših koncentracija cinka (100 i 150  $\mu\text{M}$ ) i kadmija sadržaj MDA bio viši, čak i u odnosu na tretmane u kojima je bio prisutan samo kadmij tj. njihovo djelovanje je bilo sinergističko.

Aktivnost LOX, enzima koji može pokrenuti proces lipidne peroksidacije, bila je povišena kod tretmana biljaka s 10  $\mu\text{M}$  kadmijem, u odnosu na kontrolu. Slične rezultate, koji ukazuju da je aktivnost LOX povišena uz prisutnost kadmija, dobili su i drugi istraživači (Skórzyńska–Polit i Krupa 2003, Tamás i sur. 2009, Somashekaraiah i sur. 1992, Gallego i sur. 1996). Aktivnost LOX bila je smanjena kod kombiniranog tretmana sa 100  $\mu\text{M}$  cinkom i kadmijem u odnosu na biljke tretirane samo s kadmijem, ne pokazujući statistički značajnu razliku u odnosu na aktivnost LOX kod kontrolnih biljaka. Aktivnost LOX je u biljaka tretiranih istovremeno s 50  $\mu\text{M}$  cinkom i kadmijem ostala nepromijenjena u odnosu na aktivnost u biljaka tretiranih samo s kadmijem. Obje koncentracije cinka (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) također nisu utjecale na porast aktivnosti LOX, što je u skladu s istraživanjem na vrsti *Ceratophyllum demersum* prilikom čega su primijenjene različite koncentracije cinka (Aravind i Prasad 2005). Isti autori su uočili da je kod kombinacija 10  $\mu\text{M}$  kadmija i cinka u biljkama došlo do smanjenja aktivnosti LOX. Weckx i Clijsters (1997) su uočili da je u sijanaca graha starih petnaest dana uzgajanih na supstratu s dodatkom cinka aktivnost LOX povišena. Mehanizmi promjena aktivnosti LOX i dalje nisu do kraja istraženi. Smatra se da aktivnost LOX može biti promijenjena zbog promjena redoks stanja stanice.

LOX sadrži nehemski vezano željezo, pa promjena redoks statusa može dovesti do promjene oksidacijskog stanja željeza, a kao krajnji rezultat dolazi do promjene aktivnosti LOX (Skórzyńska–Polit i sur. 2005).

ROS, osim na lipide, može djelovati i na proteine, bilo direktnom oksidacijom bočnih lanaca aminokiselina ili sekundarnim reakcijama s aldehidnim produktima lipidne peroksidacije, čime se stvaraju karbonilne grupe. Takve oksidacijske promjene mogu dovesti do promjena ili čak do inhibicije enzimske aktivnosti (Aravind i sur. 2009). U odnosu na kontrolu, sadržaj karbonila kod biljaka tretiranih s 10  $\mu\text{M}$  kadmijem bio je povišen. Povišenje sadržaja karbonilnih skupina u prisustvu kadmija primijetili su i drugi istraživači (Romero–Puertas 2002, Sandalio i sur. 2001, Balen i sur. 2011, Aravind i sur. 2009). Primjenom 50  $\mu\text{M}$  cinka nije došlo do porasta sadržaja karbonila u odnosu na kontrolu, dok je povišenje bilo prisutno nakon dvanaest dana tretmana s 100  $\mu\text{M}$  cinkom. Sadržaj karbonila u biljaka tretiranih cinkom, prisutnim u bilo kojoj od dviju koncentracija, u kombinaciji s 10  $\mu\text{M}$  kadmijem nije pokazao smanjenje u odnosu na sadržaj karbonila u biljaka tretiranih samo s kadmijem. Balen i sur. (2011) su kod vodene leće primijetili porast sadržaja karbonila prilikom primjene 25 i 50  $\mu\text{M}$  cinka u odnosu na kontrolu sedmog dana pokusa. S druge strane, također su primijetili sniženje sadržaja karbonila u biljaka tretiranih kombinacijom kadmija i cinka u odnosu na biljke tretirane samo s kadmijem. Kod *Ceratophyllum demersum* također je primijećeno smanjenje sadržaja karbonila u biljaka izloženih kombiniranim tretmanima kadmija i cinka (Aravind i sur. 2009).

Proteini toplotnog stresa (HSP) su grupa visoko konzerviranih proteina koji imaju ulogu molekularnih šaperona odgovornih za sastavljanje i stabilizaciju proteina, njihov prijenos i razgradnju u mnogim staničnim procesima. Smješteni su u citoplazmi i organelima kao što su jezgra, mitohondriji, kloroplasti i endoplazmatski retikulum. U biljkama je opisano nekoliko različitih izoformi HSP70, od čega se neki konstantno eksprimiraju, dok je za indukciju sinteze drugih potrebna prisutnost stresnih uvjeta (Wang i sur. 2004, Ireland 2004, Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999). U stresnim uvjetima imaju ulogu u popravku proteinskih oštećenja, koja su nastala djelovanjem ROS, te povratku njihove native konformacije ili sudjeluju u njihovoj razgradnji (Hall 2002, Pál i sur. 2006, Ireland i sur. 2004). Njihova ekspresija je pod kontrolom transkripcijskih faktora (eng. *heat shock transcription factors*, HSFs). U regulaciju su uključeni i jasmonska kiselina, etilen te  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rodríguez-Serrano i sur.

2009). Prisutnost proteina HSP70, kod stresa izazvanog kadmijem, primijetili su i drugi autori. Ireland i sur. (2004) dokazali su kod *Fucus serratus* povećanje sadržaja HSP70 kada je kadmij bio prisutan u koncentraciji do 25 mM, dok su kod vodene leće *Lemna minor* porast sadržaja HSP primijetili samo do koncentracije od 20 mM. Kod graška *Pisum sativum* nakon primjene 50  $\mu$ M kadmija četrnaestog dana pokusa bila je prisutna izoforma HSP molekularne mase 71,2 kDa (Rodríguez-Serrano i sur. 2009). Kadmij prisutan u hranjivoj podlozi u koncentraciji 10  $\mu$ M potaknuo je akumulaciju HSP70 u vodenoj leći *Lemna minor*, kao i indukciju sinteze dodatne izoforme dvanaestog dana pokusa (Tkalec i sur. 2008).

Dobiveni rezultati potvrđuju obrambenu ulogu cinka prilikom stresa uzrokovanog djelovanjem kadmija. Cink sprječava oksidaciju važnih staničnih komponenti kao što su membranski lipidi, klorofili i proteini (Cakmak 2000). Cink i kadmij su u kompeticiji za iste membranske prijenosnike koji pripadaju ZIP grupi (*zinc-iron permease*) (Clemens 2001). Uočeno je da su biljke izložene djelovanju kadmija akumulirale kadmij uz istovremeno smanjenje sadržaja cinka. Dodavanjem viših koncentracija cinka u hranjivu podlogu, u kojoj je bio prisutan i kadmij, povećao se sadržaj cinka uz istovremeno smanjenje sadržaja kadmija (Cherif i sur. 2011, Aravind i Prasad 2003, Hassan i sur. 2005).

U biološkim sustavima cink ima stabilno redoks stanje. Veže se na sulfhidrilne grupe membranskih proteina čime štiti proteine i lipide od oksidacije tiola i stvaranja disulfida. Vezanjem na mjesto blizu sulfhidrilnih grupa dolazi do konformacijskih promjena čime se postiže stabilnost membrana, membranskih proteina i enzima (Aravind i Prasad 2003), rezultat čega je normalna aktivnost enzima. Zaštitna uloga cinka povezana je i s inhibicijom oksidacije NADPH, potaknute kadmijem, čime se također sprječava stvaranje ROS (Aravind i Prasad 2005). U prisutnosti cinka uočena je i povećana aktivnost antioksidacijskih enzima (SOD, CAT, APX, GR) u odnosu na tretmane u kojima je bio prisutan samo kadmij (Cherif i sur. 2011).

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da kadmij u koncentraciji od 10  $\mu$ M uzrokuje oksidacijski stres u vodenoj leći (*Lemna minor*), što je vidljivo po smanjenom prirastu već petog dana pokusa, te porastu sadržaja  $H_2O_2$ , MDA i karbonila, kao i povećanoj aktivnosti LOX. Cink u koncentraciji 100  $\mu$ M također uzrokuje oksidacijski stres, no on je u odnosu na stres uzrokovan kadmijem umjeren. Kod tretmana sa 100  $\mu$ M cinkom, u odnosu na kontrolu, prisutan je smanjeni prirast

četrnaestog dana pokusa, uz istovremeni porast sadržaja  $\text{H}_2\text{O}_2$  i karbonila. Kod primjene 50  $\mu\text{M}$  cinka, u odnosu na 100  $\mu\text{M}$ , ne dolazi do smanjenja prirasta, niti do porasta sadržaja MDA, karbonila i aktivnosti LOX. Povišen je jedino sadržaj  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Kod primjene kombinacije 10  $\mu\text{M}$  kadmija i 100  $\mu\text{M}$  cinka oksidacijski stres je bio smanjen u odnosu na tretmane u kojima je bio prisutan samo kadmij (10  $\mu\text{M}$ ). Prirast vodene leće je bio veći, sadržaj  $\text{H}_2\text{O}_2$  i MDA smanjen, kao i aktivnost LOX. Sadržaj karbonila u odnosu na tretman u kojima je bio prisutan samo kadmij ostao je nepromijenjen. Također je bila prisutna i dodatna izoforma HSP70 molekularne mase ~69 kDa. Kod kombinacije 10  $\mu\text{M}$  kadmija i 50  $\mu\text{M}$  cinka, u odnosu na tretmane samo s kadmijem, prirast biljaka je bio veći; no za razliku od kombinacije 10  $\mu\text{M}$  kadmija i 100  $\mu\text{M}$  cinka nije došlo do sniženja sadržaja  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MDA i karbonila, kao ni smanjenja aktivnosti LOX.

## 6. ZAKLJUČAK

Kadmij u koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  uzrokuje oksidacijski stres, što je vidljivo po smanjenom rastu biljaka, porastu sadržaja vodikovog peroksida, lipidnoj peroksidaciji, povećanoj aktivnosti lipoksigenaze te oksidaciji proteina. Smanjeni prirast biljaka, povećani sadržaj vodikovog peroksida te oksidacija proteina upućuju na umjereni oksidacijski stres kada su biljke bile tretirane 100  $\mu\text{M}$  cinkom. Cink u koncentraciji od 50  $\mu\text{M}$  nije uzrokovao oksidacijski stres. Prilikom primjene više koncentracije cinka (100  $\mu\text{M}$ ) i kadmija uočeno je antagonističko djelovanje cinka i kadmija. Uz viši prirast biljaka smanjena je lipidna peroksidacija i aktivnost lipoksigenaze, a prisutna je bila i dodatna izoforma proteina toplotnog stresa molekularne mase ~69 kDa. Primjena niže koncentracije cinka (50  $\mu\text{M}$ ) nije smanjila oksidacijski stres uzrokovan 10  $\mu\text{M}$  kadmijem.

## 7. LITERATURA

- Abou Auda M., Ali E. E. S. (2010): Cadmium and zinc toxicity effects on growth and mineral nutrients of carrot (*Daucus carota*). *Pakistan Journal of Botany* **42**: 341–351.
- Andersson M. X., Hamberg M., Kourtchenko O., Brunnström Å., McPhail K. L., Gerwick W. H., Göbel C., Feussner I., Ellerström M. (2006): Oxylin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 31528–31537.
- Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373–399.
- Aravind P., Prasad M. N. V. (2005): Cadmium–zinc interactions in hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 3–20.
- Aravind P., Prasad M. N. V. (2003): Zinc allevates cadmium–induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 391–397.
- Aravind P., Prasad M. N. V., Malec P., Waloszek A., Strzałka K. (2009): Zinc protects *Ceratophyllum demersum* L. (free-floating hydrophyte) against reactive oxygen species induced by cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **23**: 50–60.
- Aravind P., Prasad M. N. V. (2004): Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte. *Plant Science* **166**: 1321–1327.
- Arora A., Sairam R. K., Srivastava G. C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* **82**: 1227–1238.
- Asada K. (1992): Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide–scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 235–241.
- Axelrod B., Cheesbrough T.M., Laakso S. (1981): Lipxygenase from soybeans: EC 1.13.11.12 Linoleate: oxygen oxidoreductase. *Methods in Enzymology* **71**: 441–451.
- Balen B., Tkalec M., Šikić S., Tolić S., Cvjetko P., Pavlica M., Vidaković-Cifrek Ž. (2011): Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. *Ecotoxicology* **20**: 815–826.

- Baryl A., Carrier P., Franck F., Coulomb C., Sahut C., Havaux M. (2001): Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* **212**: 696–709.
- Benavides M. P., Gallego S., Tomaro M. L. (2005): Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 21–34.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**: 179–194.
- Blum H., Beier H., Gross H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93–99.
- Broadley M., R., White P. J., Hammond J. P., Zelko I., Lux A. (2007): Zinc in plants. *New Phytologist* **173**: 677–702.
- Cakmak I. (2000): Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist* **146**: 185–205.
- Chaoui A., Ghorbal M. H., Ferjani E. E. (1997a): Effects of cadmium–zinc interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* **126**: 21–28.
- Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M. H., Ferjani E. E. (1997b): Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* **127**: 139–147.
- Cherif J., Mediouni C., Ammar W. B., Jemal F. (2011): Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Environmental Sciences* **23**: 837–844.
- Clemens S. (2001): Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475–486.
- Cross J. W. (2002). The charms of duckweed. <http://www.mobot.org/jwcross/duckweed/duckweed.htm>; pristupljeno 23.09.2011.
- Dalle–Donne I., Rossi R., Giustarini D. (2003): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* **329**: 23–38.
- Das. P., Samantaray S., Rout G. R. (1997): Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution* **98**: 29–36.
- Ensley H. E., Barber J. T., Polito M. A., Oliver A. I. (1994): Toxicity and metabolism of 2,4-diclorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**: 325–331.

- Foyer C. H., Noctor G: (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* **28**: 1056–1071.
- Gallego S. M., Benavides M. P., Tomaro M. L. (1996): Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* **121**: 151–159.
- Gallego S. M., Kogan M. J., Azpilicueat C. E., Peña C., Tomaro M. L. (2005): Glutathione-mediated antioxidative mechanisms in sunflower (*Helianthus annuus* L.) cells in response to cadmium stress. *Plant Growth Regulation* **46**: 267–276.
- Gardner H. W. (1991): Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1084**: 221–239.
- Greene R: (2002): Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants. *The Arabidopsis Book* 1: e0036. doi: 10.1199/tab.0036
- Gutteridge J. M. C. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* **41**: 1819–1828.
- Hall J. L. (2002): Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1–11.
- Hasan S. A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat S., Ahmad A. (2009): Cadmium: toxicity and tolerance in plants. *Journal of Environmental Biology* **30**: 165-174.
- Hassan M. J., Zhang G., Wu F., Wei K., Chen Z. (2005): Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **168**: 255–261.
- Hatata M. M., Abdel-Aal E. A. (2008): Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in response to cadmium treatments. *American–Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* **4**: 655–669.
- Heath R. L., Packer L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189-198.
- Hernández L. E., Cooke D. T. (1997): Modification of the root plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1375–1381.
- Ireland H. E., Harding S. J., Bonwick G. A., Jones M., Smith C. J., Williams J. H. H. (2004): Evaluation of heat shock protein 70 as a biomarker of environmental stress in *Fucus serratus* and *Lemna minor*. *Biomarkers* **9**: 139–155.
- Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D. (2005): Lindquist S., Craig E. A. (1988): The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics* **22**: 631–677.



- Khellaf N., Zerdaoui M. (2009): Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution. Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering **6**: 161–166.
- Kumari M. Sinhal V. K., Srivastava A., Singh V. P. (2011): Zinc alleviates cadmium induced toxicity in *Vigna radiata* (L) Wilczek. Journal of Phytology **3**: 43–46.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680–685.
- Leng R. A. (1999): Duckweed: A tiny aquatic plant with enormous potential for agriculture and environment. <http://www.fao.org/ag/AGAinfo/resources/documents/DW/Dw2.htm>; pristupljeno 23.09.2011.
- Levine R. L., Williams J. A., Stadtman E. R. (1994): Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology **233**: 346–357.
- Mishra S., Dubey R. S. (2006): Heavy metal uptake and detoxification mechanisms in plants. International Journal of Agricultural Research **1**: 122–141.
- Mittler R. (2002.): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science **7**: 405–410.
- Mukherjee S.P., Choudhuri M. A. (1983): Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. Physiologia Plantarum **58**: 166–170.
- Muñoz N., González C., Molina A., Zirulnik F., Luna C. M. (2008): Cadmium-induced early changes in  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  and antioxidative enzymes in soybean (*Glycine max* L.) leaves. Plant Growth Regulation **56**: 159–166.
- Neill S. J., Desikan R., Clarke A., Hurst R. D., Hancock J. T. (2002): Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. Journal of Experimental Botany **53**: 1237–1247.
- Nyström T. (2005): Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. The EMBO Journal **24**: 1311–1317.
- Osmond C. B., Austin M. P., Berry J. A., Billings W. D., Boyer J. S., Dacey J. W. H., Nobel P. S., Smith S. D., Winner W. E. (1987): Stress physiology and the distribution of plants. BioScience **37**: 38–48.
- Ouariti O., Gouia H., Ghorbal M. H. (1997): Responses of bean and tomato to cadmium: growth, mineral nutrition and nitrate reduction. Plant Physiology and Biochemistry **35**: 347–354.
- Ozdener Y., Aydin B. K. (2010): The effect of zinc on the growth and physiological and biochemical parameters in seedlings of *Eruca sativa* (L.) (Rocket). Acta Physiologiae Plantarum **32**: 469–475.

- Paczkowska M., Kozłowska M., Golinski P. (2007): Oxidative stress enzyme activity in *Lemna minor* L. exposed to cadmium and lead. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **49**: 33–37.
- Pál M., Horváth E., Janda T., Páldi E., Szalai G. (2006): Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **169**: 239–246.
- Pevalek–Kozlina B. (2003): *Fiziologija bilja. Profil*, Zagreb
- Pirson A., Seidel F. (1950): Zell- und stoffwechselphysiologische Untersuchungen an der Wurzel von *Lemna minor* L. unter besonderer Berücksichtigung von Kalium- und Calciummangel. *Planta* **38**:431–473.
- Porta H., Rocha–Sosa M. (2002): Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiology* **130**: 15–21.
- Prasad M. N. V., Malec P., Waloszek A., Bojko M., Strzalka K. (2001): Physiological responses of *Lemna trisulca* L (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. *Plant Science* **161**: 881–889.
- Radić S., Pevalek–Kozlina B. (2010): Effects of osmotic stress on antioxidative system of duckweed (*Lemna minor* L). *Periodicum biologorum* **112**: 293–299.
- Razinger J., Dermastia M., Dolenc Koce J., Zrimec A. (2008): Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environmental Pollution* **153**: 687–694.
- Rodríguez–Serrano M., Romero–Puertas M. C., Pazmiño D. M., Testillano P. S., Risueño M. C., del Río L. A., Sandalio L. M. (2009): Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* **150**: 229–243.
- Romero–Puertas M. C., Palma J. M., Gómez M., del Río L. A., Sandalio L., M. (2002): Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 677–686.
- Romero–Puertas M. C., Rodríguez–Serrano M., Corpas F. J., Gómez M., del Río L. A., Sandalio L., M. (2004): Cadmium-induced subcellular accumulation of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  in pea leaves. *Plant, Cell & Environment* **27**: 1122–1134.
- Rout G. R., Das P. (2003): Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. *Agronomie* **23**: 3–11.
- Sandalio L. M., Dalurzo H., C., Gómez M., Romero–Puertas M. C., del Río L., A. (2001): Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2115–2126.
- Sanità di Toppi L., Gabbrielli R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**: 105–130.

- Sarma H. (2011): Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology* **2**: 118–138.
- Scherr C., Simon M., Spranger J., Baumgartner S. (2008): Test system stability and natural variability of a *Lemna gibba* L. Bioassay. *PLoS ONE* 3(9): e3133. doi:10.1371/journal.pone.0003133
- Schützendübel A., Polle A. (2002): Plant responses to abiotic stresses: heavy metal–induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **372**: 1351–1365.
- Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold D. L., Polle A. (2001): Cadmium–induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. *Plant Physiology* **127**: 887–898.
- Shanker A. K. (2008): Mode of action and toxicity of trace elements. U: Prasad M. N. V. (ur.): Trace elements as contaminants and nutrients: consequences in ecosystems and human health. New Jersey, John Wiley & Sons, str. 525–555.
- Skórzyńska–Polit E., Krupa Z. (2003): The activity of lipoxygenase in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh—a preliminary study. *Cellular & Molecular Biology Letters* **8**: 279–284.
- Skórzyńska–Polit E., Pawlikowska–Pawłęga B., Szczuka E., Plak A., Melke J. (2005): Localization and activity of lipoxygenase in Cd–treated seedlings of *Phaseolus coccineus*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* **74**: 199–207.
- Somashekaraiah B. V., Padmaja K., Prasad A. R. K. (1992): Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): Involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. *Physiologia Plantarum* **85**: 85–89.
- Štefan L., Tepšić T., Zaviđić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija—uzroci i posljedice. *Medicina* **43**: 84–93.
- Tamás L., Dudíková J., Durceková K., Halusková L., Huttová J., Mistrík I. (2009): Effect of cadmium and temperature on the lipoxygenase activity in barley root tip. *Protoplasma* **235**: 17–25.
- Tewari R. K. Kumar P., Sharma P. N. (2008): Morphology and physiology of zinc–stressed mulberry plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **171**: 286–294.
- Tkalec M., Prebeg T., Roje P., Pevalek–Kozlina B., Ljubešić N (2008): Cadmium–induced responses in duckweed *Lemna minor* L. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 881–890.

- Tsang E. W. T., Bowler C., Hérouart D., Van Camp W., Villarroel R., Genetello C., Van Montagu M., Inzé D. (1991): Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *The Plant Cell* **3**: 783–792.
- Tukaj S., Bisewska J., Roeske K., Tukaj Z. (2011): Time- and dose-dependent induction of HSP70 in *Lemna minor* exposed to different environmental stressors. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **87**: 226–230.
- Valko M., Morris H., Cronin M. T. D. (2005): Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry* **12**: 1161-1208.
- Veal E. A., Day A. M., Morgan B. A. (2007): Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Molecular Cell* **26**: 1–14.
- Vidaković–Cifrek Ž. (2007): Vodena leća (*Lemna minor* L.). U: Ambriović Ristov A. (ur.): Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 122–126.
- Wang W. (1986): Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environmental Pollution* **11**: 1–14.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004): Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* **9**: 244–252.
- Weckx J. E. J., Clijsters H. M. M. (1997): Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**: 405–410.
- Wu F., Zhang G. (2002): Alleviation of cadmium-toxicity by application of zinc and ascorbic acid in barley. *Journal of Plant Nutrition* **25**: 2745–2761.
- Zhao Z. Q., Zhu Y. G., Kneer R., Smith S. E. (2005): Effect of zinc on cadmium toxicity-induced oxidative stress in winter wheat seedlings. *Journal of Plant Nutrition* **28**: 1947-1959.